

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202005008

· 论著 ·

DAPT对变应性鼻炎小鼠模型及相关细胞因子表达的影响

夏 翠, 祝 康, 郑国玺

(西安交通大学第二附属医院耳鼻咽喉头颈外科病院, 陕西 西安 710004)

摘要: **目的** 通过观察 γ -促分泌酶抑制剂(GSI) DAPT对变应性鼻炎小鼠鼻中隔黏膜病理学改变、血清IgE表达、Notch信号通路相关基因及Th型细胞因子(IL-4、IFN- γ)的表达变化,来研究DAPT对变应性鼻炎发生发展的影响及其作用机制。**方法** 选取7~8周龄BALB/c小鼠32只,随机分为4组:变应性鼻炎组、DAPT组、对照组及二甲基亚砜(DMSO)组,每组各8只。分析比较不同组小鼠IgE表达水平及鼻腔黏膜病理改变;并检测各组小鼠鼻中隔黏膜Notch相关基因的表达变化、外周血清及鼻腔灌洗液上清中相关细胞因子(IL-4、IFN- γ)的表达量。**结果** ①DAPT处理小鼠后,鼻中隔黏膜的病理损伤与模型组相比有明显改善:炎性细胞浸润逐渐减少,炎症改变明显减轻;②DAPT组小鼠血清特异性IgE抗体浓度较模型组明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$);③RT-PCR结果显示DAPT组小鼠鼻中隔黏膜Notch1、Notch3、Notch4的mRNA表达减少,与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$);相反,Notch2的表达则上升,与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$);④细胞因子的检测显示:与模型组小鼠相比,DAPT组小鼠外周血清及鼻腔灌洗液中IL-4的表达明显降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);相反,IFN- γ 的表达却升高,与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** ①DAPT能改善小鼠鼻中隔黏膜的病理损伤并减少血清中特异性抗体IgE的表达;②能影响Notch信号通路相关基因的转录,促进Th0细胞向Th1方向分化,进一步影响变应性鼻炎的发生发展。

关键词: 变应性鼻炎;Notch基因;动物; γ -促分泌酶抑制剂

中图分类号:R765.21

Effects of DAPT on allergic rhinitis model and expression of related cytokines in mice

XIA Cui, ZHU Kang, ZHENG Guoxi

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of gamma-secretase inhibitor (GSI) DAPT on the development of allergic rhinitis (AR) via observing the pathological changes of nasal septum mucosa, the expression of serum IgE, Notch signaling pathway related genes as well as Th cytokines (IL-4, IFN-gamma) in model mice with AR. **Methods** Thirty-two BALB/c mice aged 7-8 weeks were randomly and equally divided into four groups: AR group, DAPT group, control group and dimethyl sulfoxide (DMSO) group. The pathological changes of nasal mucosa in different groups were observed and compared. The expressions of Notch-related genes in nasal septum mucosa, specific IgE levels in peripheral serum as well as the expressions of cytokines (IL-4, IFN- γ) in peripheral serum and nasal lavage supernatant were detected. **Results** ①The pathological damage of nasal septum mucosa in DAPT group was significantly mild compared with that in the AR group. ②The serum specific IgE antibody concentration in DAPT group was significantly lower than that in the AR group ($P < 0.05$). ③Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) results revealed that the mRNA expressions of Notch1, Notch3 and Notch 4 in nasal septum mucosa of the DAPT group were lower than those of the AR group, and the differences were all statistically significant (all $P < 0.05$). On the contrary, the mRNA expression of Notch 2 in nasal septum mucosa of the DAPT group was higher than that of the AR group, and the difference was also statistically significant

($P < 0.05$). ④Cytokine assay showed reduced expression of IL-4 and increased expression of IFN- γ in both peripheral serum and nasal lavage supernatant of the DAPT group compared with the AR group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusions** DAPT can improve the pathological damage of nasal septum mucosa and reduce the expression of specific IgE in serum of AR mice. DAPT can affect the transcription of Notch signaling pathway related genes, promote the differentiation of Th0 cells into Th1, and further affect the occurrence and development of AR.

Keywords: Notch gene; Allergic rhinitis; Animal; Gamma-secretase inhibitor

Notch 信号通路已被用于阿尔茨海默病、肿瘤、白血病及哮喘等的研究,但尚未被用于耳鼻咽喉领域^[1]。基于以上理论,我们前期研究^[2]通过制备变应性鼻炎 BALB/c 小鼠模型,检测 Notch 基因在变应性鼻炎小鼠模型中的表达,来研究 Notch 基因对变应性鼻炎发生的作用,我们发现 Notch 基因的表达在变应性鼻炎模型小鼠发病过程中有显著改变,可能参与了变应性鼻炎的发生发展,为进一步阐释 Notch 基因在变应性鼻炎发生发展中的可能机制,本试验拟运用 γ -促分泌酶抑制剂(γ -secretase inhibitor, GSI) DAPT 抑制 Notch 信号通路,观察其对变应性鼻炎小鼠及 Th 细胞增殖分化的影响,检测 Th1/Th2 型细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 的表达情况,进一步阐释 Notch 基因在变应性鼻炎发生发展中的可能机制,为变应性鼻炎寻求新的药物治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/c 小鼠 32 只,购入时均为 7~8 周龄,平均体重 18~22 g,购买于西安交通大学医学院实验动物中心的 SPF 级实验室,并按照中心管理规定饲养动物。饲养条件为 25℃ 恒温,无特殊病原体(SPF)级层流室,每天光照和黑暗时间为 1:1 交替,自由进食标准饲料(SPF 级的固体饲料)及饮水。

主要试剂:小鼠 IL-4 Elisa 试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司);小鼠 IFN- γ Elisa 试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司);DAPT(γ -促分泌酶抑制剂,购自 Sigma Aldrich);DMSO(dimethyl sulfoxide, 二甲基亚砜,购自 Sigma 公司);电子天平(日本 Libro 公司 AEG-220G 型);自动双重纯水蒸馏器(上海玻璃仪器一厂);滑动切片(america optical corp);解剖显微镜(SZ)(OLYMPUS(日本奥林帕斯公司));电热恒温干燥箱(上海跃新科学仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物的分组及处理 BALB/c 小鼠 32 只,雌雄各半,在 SPF 级实验室适应性喂养 3 d,采用随机对照原则将小鼠分成 4 组,分别为变应性

鼻炎模型组、对照组、DMSO 组、DAPT 处理组,每组各 8 只。变应性鼻炎模型组处理方法:致敏阶段:过敏性鼻炎模型组每只 BALB/c 小鼠在第 1、5、9、12 天腹腔注射 OVA 混悬液 0.4 mL;激发阶段:第 13~20 天,用含 10% OVA 的 PBS 溶液滴鼻,每测 10 μ L,每天 1 次,共 1 周。在本课题组前期工作中^[2],通过症状学观察、病理组织及 IgE 的测定成功制备了变应性鼻炎模型。本实验变应性鼻炎模型组具体处理方法同本课题组文献报道。

对照组小鼠:致敏阶段采用 PBS 替代 OVA 混悬液致敏,其注射部位和剂量与模型组小鼠一致。激发阶段用等量的 PBS 代替 10% OVA 溶液滴鼻,时间和方式与模型组相同。

DMSO 组和 DAPT 组小鼠在每次处理前(致敏和激发阶段)30 min 腹腔注射 DMSO 和 DAPT 混悬液,其余处理方法和剂量同变应性鼻炎模型组。即致敏阶段:药物组每只 BALB/c 小鼠在第 1、5、9、12 天腹腔注射 DMSO 和 DAPT 混悬液,30 min 后 OVA 混悬液腹腔注射;其注射部位和剂量与模型组小鼠一致。

激发阶段:第 13~20 天,用 DMSO 和 DAPT 混悬液腹腔注射,30 min 后含 10% OVA 的 PBS 溶液滴鼻,每测 10 μ L,每天 1 次,共 1 周。时间和方式与模型组相同。

4 组小鼠均在最后 1 次激发后 24 h 收集标本。

1.2.2 观察 4 组小鼠鼻中隔黏膜形态学 最后 1 次激发 24 h 后麻醉处死小鼠,显微镜下剥离鼻部皮肤,将连同鼻腔的上颌骨取下,从中切齿间可完整分离双侧鼻腔,小心取出并分离鼻腔鼻中隔黏膜组织,以 1% PBS 冲洗,切取 1/2 组织,用 10% 的多聚甲醛固定 24 h,制成常规石蜡切片,H-E 染色,观察鼻中隔黏膜组织的病理改变。另外 1/2 装入冷冻管中,置于 -80℃ 液氮中保存,作为鼻中隔黏膜标本。

1.2.3 RT-PCR 检测小鼠鼻中隔黏膜中 Notch 基因的表达 鼻中隔黏膜总 RNA 的提取:通过逆转录,获得鼻中隔黏膜 cDNA,按照试剂盒说明操作,所用塑料制品均经过 DEPC 处理水浸泡,并高温高压灭菌,烘干备用。取 200 μ L 的离心管置于冰上,加样后温和混匀,稍做离心(3~5 s),70℃ 加温,5 min,

稍做离心,将离心管置于冰上,依次加入 $4 \mu\text{L}$ $5 \times$ reaction buffer; $1 \mu\text{L}$ Ribolock Ribonuclease inhibitor ($20 \text{ U}/\mu\text{L}$); $2 \mu\text{L}$ 10 mM dNTP mix 温和混匀,稍做离心(25°C , 反应 5 min); 取 $1 \mu\text{L}$ Revert Aid M-MuLV Reverse Transcriptase 加入上述混合物, 25°C 5 min 后, 42°C 60 min ; 将终产物在 70°C 10 min 后终止反应,并冷却,置 -80°C 保存备用;最后进行 4 种 *Notch* 基因 cDNA 产物的 PCR 扩增。

1.2.4 细胞因子的检测 分别收集 DAPT 组小鼠、模型组、对照组合 DMSO 组 4 组小鼠的鼻腔盥洗液和外周血血清,继而检测 4 组小鼠外周血血清 IgE, 并检测血清、鼻腔盥洗液上清中 IL-4、IFN- γ 。

IgE 浓度的测定: 取小鼠眼球抗凝全血 $1 \sim 1.5 \text{ mL}$, 置于 EP 管内,于 $3\ 500 \text{ r}/\text{min}$ 离心 15 min , 吸取血清,按 Elisa 试剂盒操作说明,测定血清中特异性抗体 IgE 的浓度。

IL-4、IFN- γ 的测定 按照 IL-4、IFN- γ Elisa 试剂盒操作步骤进行。

1.3 统计学方法

运用统计学软件 SPSS 17.0 进行统计学处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。完全随机设计的计量资料采用 One-way ANOVA 单因素方差分析,首先进行正态性检验和方差齐性检验,再进行方差分析,任意两组计量资料间两两比较采用 LSD 或 Durmett-T3 法。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻腔组织病理结果

模型组小鼠鼻黏膜上皮脱落、坏死而不连续

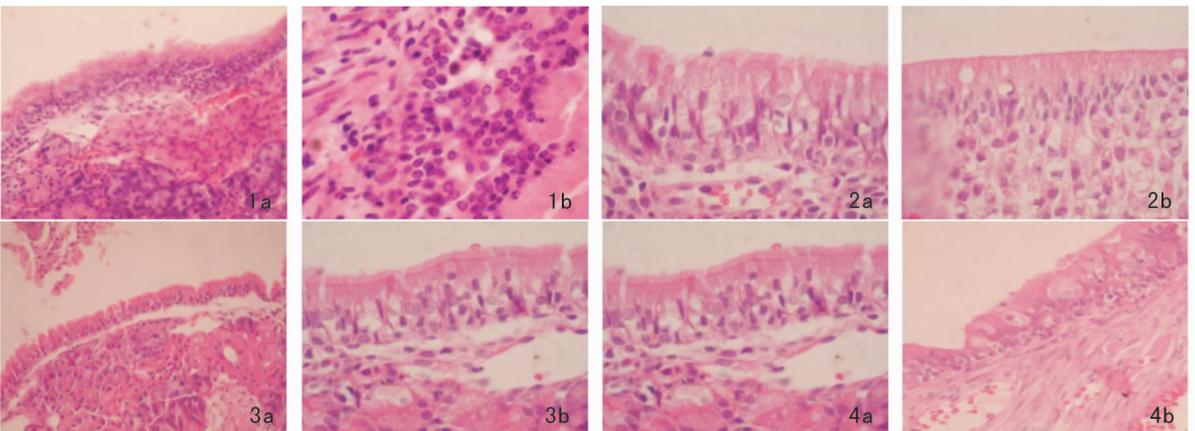


图1 模型组小鼠鼻中隔黏膜病理改变 1a:HE $\times 100$;1b:HE $\times 400$ **图2** 对照组小鼠鼻中隔黏膜的病理改变 2a、2b: HE $\times 400$ **图3** DAPT 干预组小鼠鼻中隔黏膜病理改变 3a:HE $\times 100$;3b:HE $\times 400$ **图4** DMSO 组小鼠鼻中隔黏膜病理改变 4a:HE $\times 400$;4b:HE $\times 100$

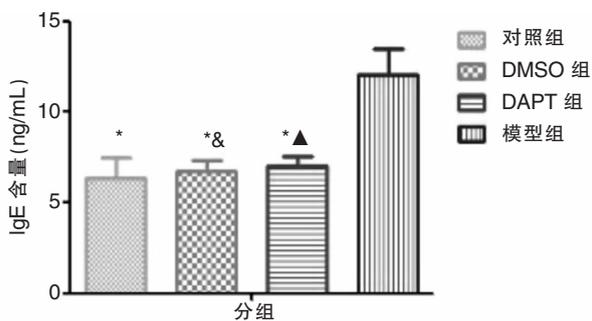
(图 1a), 炎细胞浸润明显,组织间隙出血、腺体增生、肿胀,杯状细胞增生,黏膜表面分泌物增多,鼻黏膜下组织间质水肿,小血管扩张(图 1b)。对照组小鼠鼻中隔黏膜纤毛上皮完整光滑、无断裂,未见明显的炎性细胞浸润(图 2)。DAPT 组小鼠鼻腔黏膜较模型组小鼠有明显的改善,组织间隙炎性细胞浸润明显减少,腺体增生减轻,鼻黏膜上皮部分脱落、坏死,纤毛光滑不连续,黏膜表面少量分泌物(图 3)。DMSO 组小鼠鼻黏膜组织病理形态学表现为假复层纤毛柱状上皮结构平滑,偶有局部微小面积断裂,局部有轻微炎症反应和炎性细胞浸润(图 4)。

2.2 各组小鼠外周血血清中 IgE 的表达

同一实验条件下,DAPT 组小鼠与模型组比较,外周血血清中 IgE 的表达量明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而与对照组、DMSO 组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 5。

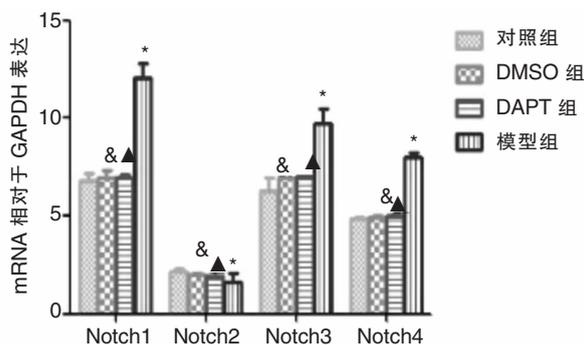
2.3 各组小鼠鼻中隔黏膜中 *Notch* 基因的表达

模型组小鼠鼻中隔黏膜 *Notch1*、*Notch3*、*Notch4* 的 mRNA 表达量明显升高,和 DAPT 干预组、DMSO 组及对照组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$),而 DAPT 干预组和 DMSO 组及对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$),DMSO 组和对照组相比差异也无统计学意义($P > 0.05$);相反模型组小鼠 *Notch2* 的 mRNA 表达量却下降,与其余各组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$),而其余 3 组两两相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 6。



注: * 表示与模型组比较, $P < 0.05$; ▲ 表示与对照组和 DMSO 组比较, $P > 0.05$; & 表示与对照组比较, $P > 0.05$ 。

图 5 各组小鼠血清 IgE 含量比较柱状图

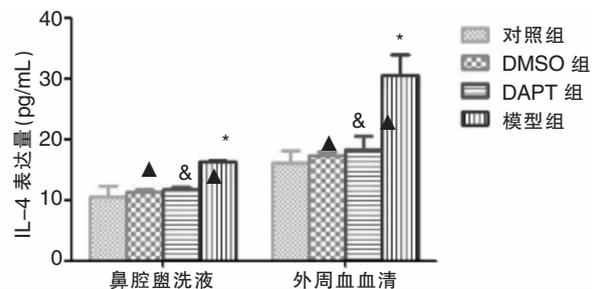


注: * 表示模型组与其余各组相比, $P < 0.05$; ▲ 表示与对照组和 DMSO 组比较, $P > 0.05$; & 表示与对照组比较, $P > 0.05$ 。

图 6 各组小鼠鼻中隔黏膜 Notch1-4 的表达量比较

2.4 各组小鼠 IL-4 和 IFN- γ 表达结果

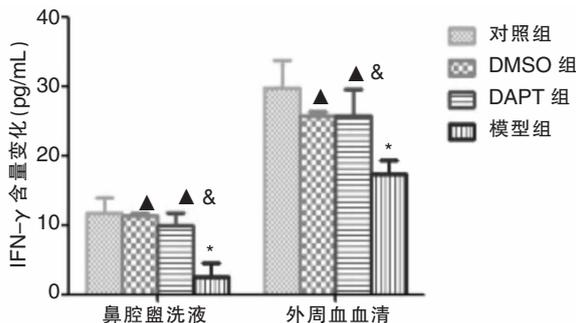
同一实验条件下, IL-4 在不同组小鼠鼻腔盥洗液和外周血血清中的表达量如图 7, 模型组分别与其余各组比较, IL-4 表达明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 DAPT 干预组分别与对照组、DMSO 组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), DMSO 组与对照组相比差异也无明显的统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: * 表示模型组与其余各组相比, $P < 0.05$; ▲ 表示与对照组比较, $P > 0.05$; & 表示与 DMSO 组比较, $P > 0.05$ 。

图 7 各组小鼠 IL-4 表达量的变化

洗液和外周血血清中的表达量见图 8, 模型组分别与其余各组比较, IFN- γ 的表达量明显下降, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 DAPT 组与 DMSO 组、对照组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), DMSO 组和 DAPT 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: * 表示模型组与其余各组相比, $P < 0.05$; ▲ 表示与对照组比较, $P > 0.05$; & 表示与 DMSO 组比较, $P > 0.05$ 。

图 8 各组小鼠 IFN- γ 表达量的变化

3 讨论

变应性鼻炎是以特异性个体接触变应原后由 IgE 介导的介质释放为开端, 同时有多种免疫活性细胞及其细胞因子参与导致的鼻黏膜炎症反应性疾病^[3]。现代医学研究表明, Th 1/Th2 的失衡被认为是变应性鼻炎发病的核心病理环节^[4-5]。同时, IL-2、IL-4 及 IFN- γ 被公认为是变应性鼻炎发生发展过程中极为重要的细胞因子^[6], 在 Th0 是否过度向 Th2 方向分化中起着决定性作用。其中 IL-4 被认为是变应性疾病过程中起着主导作用的因子, 其含量的降低可以影响呼吸道变应性疾病的发生发展^[7-8], 而 IFN- γ 是 IL-4 合成的生物拮抗剂, 是一种抗变应性疾病的因子, 可抑制 IL-4mRNA 的转录水平和体内 IgE 的合成, 其含量的增加可以提高机体的免疫力, 有助于呼吸道变应性疾病发生的预防^[9]。Mai 等^[10]通过对鼻腔分泌物检测, 证实了变应性鼻炎患者在接触变应原后鼻腔分泌物中 IL-4 含量显著增加。Aslam 等^[11]的研究表明, IgE 升高与 IL-4 分泌过多成正相关, 而与 IFN- γ 、IL-2 分泌呈负相关关联。因此, 在变应性鼻炎的发病过程中, 变应原的刺激导致 Th0 向 Th2 分化加强, 同时抑制了 Th 1 的分化, 从而使患者血清中 IL-4 及 IgE 含量增高, 而 IL-2 和 IFN- γ 含量相对降低。本实验通过建立变应性鼻炎 BALB/c 小鼠模型, 通过测定小鼠外周血血清、鼻腔盥洗液中 IL-4、IFN- γ 含量, 结果显示较对照组而言, 模型组小鼠 IFN- γ 含量明显降低, 而 IL-4 含量明

同一实验条件下, γ -IFN 在不同组小鼠鼻腔盥

显升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),符合 Th1/Th2 失衡机制的表现,且模型组小鼠外周血清中 IgE 含量较对照组显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),与变态反应疾病特点相互吻合。

基于对 Th 1/Th2 失衡的认识和既往变应性鼻炎治疗效果的研究进展,以纠正 Th 1/Th2 失衡为目的来研究治疗变应性鼻炎的新药物已成为大多医学工作者的主要思路^[12],同时也为验证临床有效药物提供了有力的实验室证据。而研究的核心即是应用药物干预以减轻 Th2 分化倾向,增强 Th 1 反应,从而纠正 Th 1/Th2 失衡,达到治疗变应性鼻炎的目的。已有大量研究^[13]提出 Notch 信号通路除了在肿瘤及血液系统疾病中发挥重要作用外,其可能在 Th1 或 Th2 介导的各种变应性疾病的发生、发展中也扮演着重要角色。

本实验研究中通过 DAPT 干预 Notch 信号通路后,观察到鼻中隔黏膜的病理损伤与模型组相比有明显改善:DAPT 组小鼠鼻中黏膜开始修复,炎性细胞浸润逐渐减少,炎症改变明显减轻,血清特异性 IgE 抗体浓度也开始下降。差异具有统计学意义($P < 0.05$),而与对照组和 DMSO 组相比 $P > 0.05$; RT-PCR 结果显示 DAPT 组小鼠鼻中隔黏膜 *Notch* 基因的表达也有明显的改变:Notch1、Notch3、Notch4 的 mRNA 表达减少,与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$),而与对照组和 DMSO 组均接近($P > 0.05$);相反,Notch2 的表达则上升,与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),而与对照组和 DMSO 组均接近($P > 0.05$);细胞因子的检测显示:与模型组小鼠相比,DAPT 组小鼠外周血清及鼻腔盥洗液中 IL-4 的表达明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而与 DMSO、对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$);相反,IFN- γ 的表达却升高,与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$),而与对照组、DMSO 组接近($P > 0.05$)。说明 DAPT 通过阻断 Notch 信号通路,选择性调节 *Notch* 基因的表达,进一步影响了 Th1/Th2 的失衡,通过增加 Th1 型细胞因子(IFN- γ)的表达并抑制 Th2 型细胞因子的表达来促使 Th 细胞向 Th1 分化,进而调节了变应性鼻炎的发生发展。

通过本实验,最终证实 Notch 信号通路特异性抑制剂(DAPT)具有调节 Th 1/Th2 失衡的作用,可以通过调节 Th1/Th2 平衡来达到改善变应性鼻炎症状及治疗变应性鼻炎的目的,为变应性鼻炎寻求新的药物治疗提供理论基础。

参考文献:

- [1] 杨娟,许小凡,段丽芳,等. Notch 信号通路在胰腺炎症及肿瘤进展中的作用[J]. 解放军医学杂志,2020,45(2):219-223.
- [2] 刘亮亮,韦俊荣,郑国玺,等. Notch 基因在变应性鼻炎小鼠模型中的表达及其意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(20):1585-1589.
- [3] 张罗,韩德民. 重视变应性鼻炎研究[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2010,45(6):441-443.
- [4] Yuan J, Li J, Huang SY, et al. Characterization of the subsets of human NKT-like cells and the expression of Th1/Th2 cytokines in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. J Reprod Immunol,2015,110:81-88.
- [5] 王豪,陈仁辉,钟燕青,等. 变应性鼻炎患者外周血中神经养因子 mRNA 的表达及与 Th1/Th2 免疫失衡的关系[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(14):1024-1027.
- [6] 马瑞霞,侯丽,虎峻瑞. 观察防风固本颗粒对变应性鼻炎肺郁脾虚患者外周血单个核细胞培养上清中 IL-4、IL-5、IL-10、IFN- γ 细胞因子水平的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2017,31(21):1662-1665.
- [7] 陈歌子,张卫. Fc ϵ R I、IL-4、IL-13 和 IL-4R 基因多态性与过敏性疾病的关系[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2016,10(6):877-881.
- [8] Al-Muhsen S, Vazquez-Tello A, Alzaabi A, et al. IL-4 receptor alpha single-nucleotide polymorphisms rs1805010 and rs19 associated with increased risk of asthma in a Saudi Arabian population [J]. Ann Thorac Med,2014,9(2):81-86.
- [9] Shin J, Kim KP, Yoon AH, et al. Alterations in IL-4, IL-10 and IFN- γ levels synergistically decrease lipid content and protein expression of FAS and mature SPEBP-1 in human sebocytes [J]. Arch Dermatol Res,2019,311(7):563-571.
- [10] Mai XM, Chen Y, Camargo CA Jr, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and self-reported allergic rhinitis in Norwegian adults The HUNT Study [J]. Allergy,2014,69(4):488-493.
- [11] Aslam H, Shahzad M, Shabbir A, et al. Immunomodulatory effect of thymoquinone on atopic dermatitis [J]. Mole Immunol,2018,101:276-283.
- [12] Pfaar O, Demoly PR, Wijk GVS, et al. Recommendations for the standardization of clinical outcomes used in allergen immunotherapy trials for allergic rhinoconjunctivitis: an EAACI Position Paper [J]. Allergy,2014,69(7):854-867.
- [13] Koyanagi A, Sekine C, Yagita H. Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells [J]. Biochem Biophys Res Commun,2012,418(4):799-805.

(收稿日期:2020-01-02)

本文引用格式:夏翠,祝康,郑国玺. DAPT 对变应性鼻炎小鼠模型及相关细胞因子表达的影响 [J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2020,26(5):512-516. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202005008

Cite this article as: XIA Cui, ZHU Kang, ZHENG Guoxi. Effects of DAPT on allergic rhinitis model and expression of related cytokines in mice [J]. Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg, 2020,26(5):512-516. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202005008