

DOI:10.13350/j.cjpb.240803

• 论著 •

A549 细胞针对 A 型流感病毒的抗病毒反应*

杨宣叶^{1,2}, 高明阳^{1,2}, 胡欣妍^{1,2}, 王进千^{1,2}, 马晓霞^{1,2,*}(1. 西北民族大学生物医学研究中心, 生物工程与技术国家民委重点实验室, 甘肃兰州 730030;
2. 西北民族大学生命科学与工程学院)

【摘要】 目的 了解 IAV 在 A549 细胞中的增殖, 探究 IAV 感染 A549 细胞后所被激活的抗病毒反应。方法 以 IAV 感染人肺腺癌上皮细胞(A549)细胞为模型, 通过实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR)、Western blot 以及噬斑实验测定 IAV 在 A549 细胞中的增殖。Western blot 检测 IAV 感染 A549 细胞 36 h 后, p-NF-κB、IκBα 和 p-IκBα 蛋白表达水平。通过 qRT-PCR 检测 IFN 信号通路的激活以及 IFN 刺激基因的表达。收集 IAV 感染 A549 细胞 36 h 及 48 h 上清, 与新鲜培养基混合培养 IAV 感染 A549 细胞, qRT-PCR 法检测内源性 IFN 对 IAV 增殖的抑制作用。结果 IAV 感染 A549 细胞 36 h 后 RNA 水平达到最高值 4.86×10^6 , Western blot 与噬斑试验均证明 IAV 在 A549 细胞中有效增殖。IAV 显著促进 A549 细胞中磷酸化 NF-κBp65 和磷酸化 IκBα 的蛋白表达。IAV 可有效激活 A549 细胞中的 IFN 信号通路, 并诱导产生 I 型 IFN(IFNβ) 以及 III 型 IFN(IFNλ1、IFNλ2、IFNλ3) 为主的细胞因子, 其中 36 h 分别是 0 h 的(16.77 ± 0.6614)、(323.5 ± 41.88)、(3632 ± 240.2) 和(4690 ± 231.3) 倍。同时, IAV 感染 A549 细胞后可诱导产生一系列具有广谱抗病毒作用的 IFN 刺激基因(IFN-stimulated genes, ISGs), 如 CXCL10、RIG-I、MX1、CCL5、IFI27、STAT1、ISG15, 分别是对照组的(684.8 ± 50.37)、(70.19 ± 2.917)、(290.8 ± 10.71)、(203.8 ± 4.994)、(205.0 ± 6.046)、(5.974 ± 0.1550) 和(603.0 ± 70.25) 倍。此外, 收集的病毒感染 36h 和 48 h 的细胞培养上清对病毒复制均有显著的抑制作用, 分别为对照组的(-0.1231 ± 0.05704) 和(-0.3519 ± 0.05257) 倍。结论 IAV 感染 A549 细胞激活 IFN 与 ISGs, 有效促进磷酸化 NF-κBp65 的蛋白表达, 为研究不同细胞系针对不同亚型流感病毒的抗病毒反应的差异提供参考依据, 有助于进一步探究 IAV 与常用细胞系 A549 的相互作用机理。

【关键词】 甲型流感病毒; 干扰素; NF-κB; 抗病毒反应

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)08-0880-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Aug.; 19(8):880-885.]

Antiviral response of A549 cells against Influenza A virus

YANG Xuanye^{1,2}, GAO Mingyang^{1,2}, HU Xinyan^{1,2}, WANG Jinqian^{1,2}, MA Xiaoxia^{1,2} (1. Key Laboratory of Biotechnology and Bioengineering of State Ethnic Affairs Commission, Biomedical Research Center, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China; 2. College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University) ***

【Abstract】 **Objective** To verify the proliferation of influenza A virus in A549 cells and explore the antiviral response activated by IAV infection in A549 cells. **Methods** Using human lung adenocarcinoma epithelial cells (A549) as a model for IAV infection, IAV proliferation in A549 cells was determined by Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR), Western blot and Plaque assay. NF-κB, IκBα and p-IκBα protein level were detected by Western blot while the activation of IFN signaling pathway and the expression of IFN stimulated genes (ISGs) were tested through qRT-PCR. The supernatants of A549 cells infected with IAV for 36h or 48h were collected and mixed with fresh culture medium, which in turn used to culture new IAV infected A549 cells. Finally, qRT-PCR was used to detect the inhibitory effect of endogenous IFN on IAV proliferation. **Results** After 36 hours of IAV infection in A549 cells, the RNA level reached its highest value of 4.86×10^6 . IAV proliferates efficiently in A549 cells and induces p-NF-κBp65 and p-IκBα protein expression significantly. IAV effectively activate the IFN signaling pathway in A549 cells and induce the production of cytokines dominated type I IFN (IFNβ) and type III IFN (IFNλ1, IFNλ2, IFNλ3) with 36 hours being (16.77 ± 0.6614), (323.5 ± 41.88), (3632 ± 240.2) and (4690 ± 231.3) times higher than 0 hours. Meanwhile, IAV infection of A549 cells can induce the production of a series of IFN stimulated genes (ISGs) with broad-spectrum antiviral effect, such as CXCL10, RIG-I, MX1, CCL5, IFI27, STAT1 and ISG15, which are (684.8 ± 50.37), (70.19 ± 2.917), (290.8 ± 10.71),

* **【基金项目】** 中央高校基本科研业务费专项资金资助(NO. 31920220134); 甘肃省自然科学基金(20JR5RA505)。

** **【通讯作者】** 马晓霞, E-mail: maxiaoxia956@163.com

【作者简介】 杨宣叶(2001-), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 从事病毒基因工程研究工作。E-mail: yangxuanye2001@163.com

(203.8±4.994), (205.0±6.046), (5.974±0.1550) and (603.0±70.25) times higher than the control group. Furthermore, the cell culture supernatants collected after 36 and 48 hours of IAV infection showed significant inhibitory effects on IAV replication, which were (-0.1231±0.05704) and (-0.3519±0.05257) times higher than the control group. **Conclusion** In this study, IAV infection activates IFN and ISGs and significantly promoted phosphorylation of NF-κB p65 protein in A549 cells. To provide reference basis for studying the differences in antiviral responses of different cell lines against different subtypes of influenza virus, and to further explore the interaction mechanism between IAV and commonly used cell line A549.

【Keywords】 Influenza A virus (IAV); interferon (IFN); nuclear factor-κB (NF-κB); antiviral response

急性呼吸道病毒感染仍是影响全球的严重疾病,已经过去的 SARS CoV-2 大流行以及当前的流感病毒流行带来的挑战愈加严峻^[1-2]。流感病毒属正粘病毒科得一种包膜病毒,包含由 8 条单股负链 RNA 片段组成的基因组,能够编码十余种病毒侵染宿主以及完成自身复制所依赖的蛋白^[3]。A 型流感病毒 (Influenza A virus, IAV) 易发生抗原变异且常造成临床重症,对全球公共卫生安全及经济健康发展造成严重危害。

流感病毒在侵入机体后,激活宿主的抗病毒反应,其中干扰素及干扰素刺激因子在抗病毒过程中发挥着重要作用^[4]。但三种干扰素可能在流感病毒感染过程中所发挥的抗病毒作用并不一致,明确何种干扰素能够发挥较好的抗病毒作用以及在宿主细胞和病原微生物之间的差异,对干扰素的抗病毒作用研究具有重要意义。经典的 NF-κB 通路作为抗病毒反应中的重要组成部分,常被认为是病毒入侵机体后,能够被激活并显著增强抗病毒因子的表达水平^[5-6]。通过 NF-κB 通路调节 IFN 反应激活 IFN 刺激基因也是机体发挥抗病毒效应的重要组成部分^[7-8]。病毒入侵后,宿主特异性识别病原体相关模式分子 (pathogen associated molecular patterns, PAMP) 并激活转录因子,例如 IFN 调节因子和 NF-κB,使这些转录因子易位至细胞核,激活 IFN 和其他促炎细胞因子的表达。IFN 被分泌并与相同和邻近细胞上的受体结合,激活更广泛的 IFN 刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs),从而激活了一系列抗病毒反应^[9]。此外, NF-κB 也会通过调节 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 影响 T 细胞的功能,这将影响 T 细胞所介导的细胞免疫反应^[10-11]。为了应对宿主免疫反应的攻击,病毒为了自身的复制进行免疫逃避和抑制宿主免疫应答。因此, IAV 在侵染宿主时会通过 NF-κB 来抑制 IFN 的信号转导,从而促进自身的复制^[12]。研究表明 NF-κB 的激活促进病毒 RNA 的复制^[13-16]。同时,本课题组前期研究发现,现有的免疫抑制剂能够以不同的作用机制抑制 IAV 在 A549 细胞中的增殖^[17]。这表明流感病毒可能将这种抗病毒和促炎反应转化为有利于病毒

复制的途径,抑制宿主免疫反应也会影响病毒的复制。流感病毒激活的宿主先天免疫反应 (Innate immunity response) 是复杂且多样的,研究 IAV 激活 A549 细胞的抗病毒反应有助于进一步探究 IAV 与 A549 细胞的相互作用机理。

本研究以 IAV 感染 A549 细胞为模型,检测病毒感染后是否通过激活 NF-κB 和 IFN 的产生发挥宿主细胞的先天性免疫应答,以及产生的 IFN 及其诱导的 ISGs 是否发挥抗病毒作用,以期为探究不同细胞系针对不同亚型流感病毒的抗病毒反应的差异提供参考依据。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞株和毒株 A549 (人肺腺癌上皮细胞) 和 MDCK (犬肾上皮细胞) 细胞由西北民族大学生物医学研究中心提供; IAV 疫苗毒株 A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180) 为武汉生物制品研究所国家联合疫苗工程技术研究中心提供, -80 °C 保存备用。

1.2 主要试剂及仪器 F12 培养基、DMEM 培养基和 0.25% 胰酶-EDTA 购自兰州百灵生物工程有限公司; 胎牛血清 (FBS) 购自兰州民海生物工程有限公司; 总 RNA 提取试剂盒 (Total RNA Isolation Reagent) 购自美国 Biosharp 公司; 反转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒购自南京诺唯赞医疗科技有限公司; 核转录因子-κB p65 (NF-κB p65) 抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司; 核转录因子-κB (NF-κB) 抑制蛋白 (IκBα)、p-IκBα 和 IAV-NP 蛋白抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; GAPDH 抗体 (AP0066) 购自南京 Bioworld 公司; β-Tubulin 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗购自武汉 Abbkine Scientific 公司; RIPA 裂解液、PMSF 购自北京索莱宝公司; 特超敏 ECL 发光底物显色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Biosharp 公司; 聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

2 方法

2.1 细胞培养 将保存于液氮中的 A549 和 MDCK

细胞于 37 °C 温水中快速溶解, 1 000g 离心 6 min, 弃上清, 分别用含 10% FBS 的 F12 培养基和 DMEM 培养基重悬细胞, 转移至细胞培养瓶中, 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 传代 2 次以上。

2.2 IAV 在 A549 细胞中增殖以及 IFN、ISGs 的检测 将 A549 细胞按照 3 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 用含 10% FBS 的 F12 培养基于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 12 h, 用 0.1 MOI 的 IAV 感染细胞, 分别培养 12、24、36、48、60 h 后收获细胞及上清, 同时设不接毒对照组。TRIzol 法提取细胞 RNA, 使用反转录试剂盒反转录合成 cDNA, qRT-PCR 法检测病毒在 A549 细胞中的增殖情况以及 IFN 和 ISGs 的激活水平。以 GAPDH 为内参, 通过 2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 相对表达量。培养后 36 及 48 h 上清液, 经紫外线照射 30 min, 与新鲜培养基 1 : 1 混合后加入新的 IAV 感染的 A549 细胞中, 继续培养 36 h, 以不接毒收获的上清培养 IAV 感染的 A549 细胞作为对照组。收获细胞, TRIzol 法提取 RNA, 使用反转录试剂盒反转录合成 cDNA, qRT-PCR 法检测内源性 IFN 的抗病毒作用。IAV(H1N1) PB1、GAPDH、IFN 以及 ISG 基因等检测引物序列见表 1, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。具体实验方法参考文献[18]。

2.3 噬斑试验 将 MDCK 细胞接种于 6 孔板中, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞汇合度达到 95% 时, 用稀释的细胞培养上清液感染细胞 2 h, 然后弃掉上清液, 加入琼脂糖覆盖层, 包含 1 × DMEM、1% 低熔点琼脂糖和 2 μg/mL TPCK 处理的胰蛋白酶。在 37 °C 下孵育 72 h 后, 可见明显斑块出现, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 1 h, 后用 2% 结晶紫溶液染色 30 min。

2.4 Western blot 将 A549 细胞接种于 6 孔板中, 细胞汇合度达到 80% 按 MOI=0.1 接种 IAV, 后置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。分别收取 0 h、36 h 和 48 h 细胞, 加入 RIPA 中性蛋白裂解液, 在冰上裂解 30 min 后, 12 000 r/min 4 °C 离心 20 min。后收取裂解液上清, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量所收取蛋白, 后加入蛋白上样缓冲液混匀后 100 °C 煮样 15 min, 将 15 μg 蛋白样品加入 10% 的 SDS-PAGE 中, 然后转移到 PVDF 膜上。转膜后, 使用 5% 脱脂奶粉将膜在室温下封闭 2h, 然后一抗 4 °C 过夜孵育, 后使用 TBST 洗膜后, 二抗在室温下孵育 1 h, 后使用 TBST 洗膜。将膜浸入特超敏 ECL 发光底物显色液 2 min, 使用电化学发光检测系统检测 p-NF-κBp65、IκBα 和 p-IκBα 蛋白表达情况。

3 统计学分析

使用 GraphPad Prism version 6 软件进行统计学

分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One Way ANOVA test、t-test 分析。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 引物
Table 1 Primers for qRT-PCR

基因 Genes	引物序列(5'-3') Primer sequences
IAV PB1-F	ATGGAATATGACGCTGTTG
IAV PB1-R	TTGGCTTGTTGAGAATAG
Humo-GAPDH-F	CTCTGGTAAAGTGGATATTGT
Humo-GAPDH-R	GGTGGAAATCATATTGGAACA
Humo-IFN-α-F	GCTTGGGATGAGACCCTCCTA
Humo-IFN-α-R	CCCACCCCTGTATCACAC
Humo-IFN-β-F	ATGACCAACAAGTGCTCTCCTCC
Humo-IFN-β-R	GGAATCCAAGCAAGTTGTAGCTC
Humo-IFN-γ-F	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA
Humo-IFN-γ-R	TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC
Humo-IFN-λ1-F	CACATTGGCAGGTTCAAATCTCT
Humo-IFN-λ1-R	CCAGCGGACTCCTTTTTGG
Humo-IFN-λ2-F	GAGACCTGAATTGTGTTG
Humo-IFN-λ2-R	AATTAAGACAAGTGGCTAAT
Humo-IFN-λ3-F	ACATAGCCCAGTTC AAGT
Humo-IFN-λ3-R	CGACTCTTCTAAGGCATCT
Humo-IFI27-F	TGCTCTACCTCATCAGCAGT
Humo-IFI27-R	CACAACCTCTCCAATCACAAC
Humo-RIG- I-F	CTGGACCCTACCTACATCCTG
Humo- RIG- I-R	GGCATCCAAAAAGCCACGG
Humo-STAT1-F	CAGCTTGACTCAAAAATTCCTGGA
Humo-STAT1-R	TGAAGATTACGCTTGCTTTTCTCT
Humo-CXCL10-F	GTGGCATTCAAGGAGTACCTC
Humo-CXCL10-R	TGATGGCCTTCGATTCTGGATT
Humo-MX1-F	GTTTCCGAAGTGGACATCGCA
Humo-MX1-R	CTGCACAGGTTGTCTCAGC
Humo-CCL5-F	GGCAGCCCTCGCTGTCTATCC
Humo-CCL5-R	GCAGCAGGGTGTGGTGTCCG
Humo-ISG15-F	GTTTCATGAATCTGCGCCTGC
Humo-ISG15-R	ATTTCCGGCCCTTGATCCTG

结 果

1 IAV 在 A549 细胞中的增殖

IAV 感染 A549 细胞后 12、24、36 h, 病毒增殖逐渐增强, 36 h 时 RNA 水平达到 4.86 × 10⁶, 36~48 h 病毒增殖达到峰值并开始下降, Western blot 检测病毒 NP 蛋白表达增加和噬斑实验检测病毒的释放增加(图 1)。

2 检测 p-NF-κBp65、IκBα、p-IκBα 蛋白表达水平

与对照组比较, IAV 感染 A549 细胞 36 h 后, 显著促进磷酸化 NF-κBp65 和磷酸化 IκBα 的蛋白表达, 接毒组 IκBα 与对照组 IκBα 蛋白表达未见明显差异。

3 IAV 对 A549 细胞 IFN 通路的激活作用

IAV 感染 12 h 后, A549 细胞中 IFNβ、IFNλ1、IFNλ2、IFNλ3 的转录水平有不同程度的升高, 36 h 达到峰值(图 3), 分别是 0 h 的(16.77 ± 0.6614)、(323.5

±41.88)、(3632±240.2)和(4690±231.3)倍,差异均有统计学意义(t 分别为25.36、7.722、15.12和20.28, P 均<0.05)。同时,IAV感染A549细胞36h后,刺激了IFN下游通路一些具有广谱抗病毒作用的IFN刺激基因CXCL10、RIG-I、MX1、CCL5、IFI27、STAT1、ISG15的表达(图4),分别是0h的(684.8±50.37)、(70.19±2.917)、(290.8±10.71)、(203.8±4.994)、(205.0±6.046)、(5.974±0.1550)和(603.0±70.25)倍,差异均有统计学意义(t 分别为13.60、24.06、27.16、40.81、33.91、38.53和8.584, P 均<0.05)。

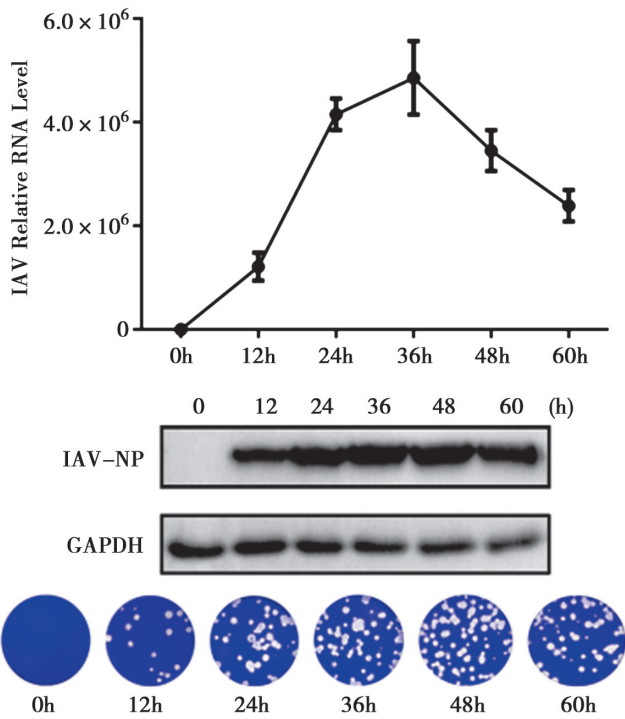


图1 IAV在A549细胞中的增殖
Fig. 1 IAV replication in A549 cells

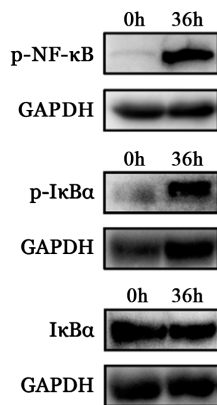
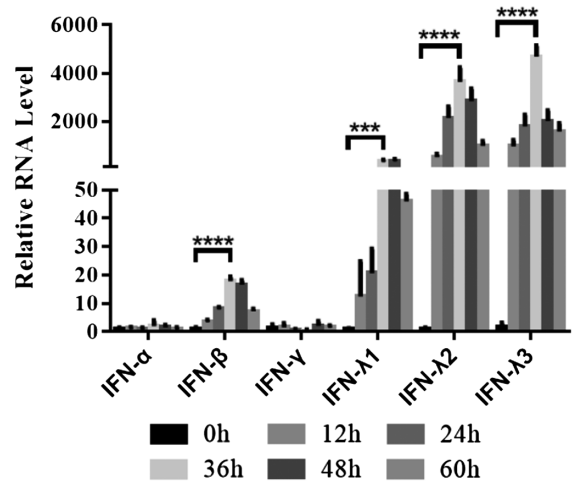


图2 p-NF-κBp65、IκBα和p-IκBα蛋白表达水平
Fig. 2 p-NF-κBp65, IκBα and p-IκBα protein expression level

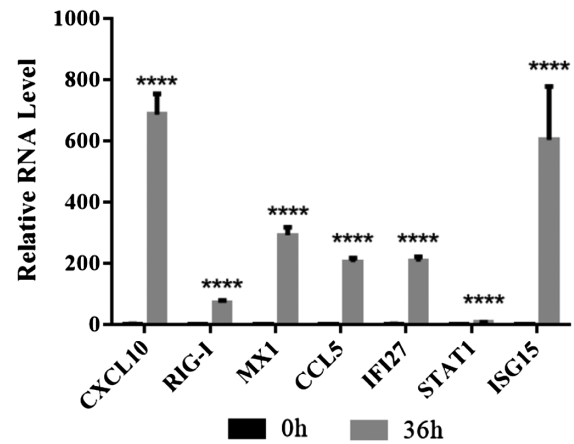
4 IAV感染A549细胞产生IFN的抗病毒作用

与对照组相比,收集的病毒感染36h和48h的

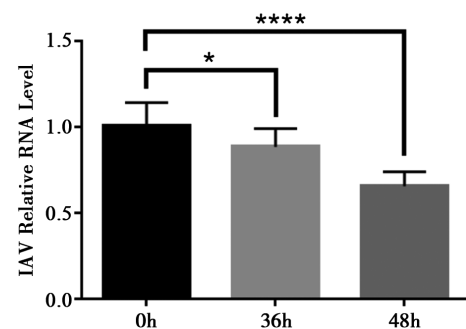
细胞培养上清对病毒的RNA复制均有显著的抑制作用,分别为对照组的(-0.1231±0.05704)和(-0.3519±0.05257)倍,差异均有统计学意义(t 分别为2.157和6.695, P 均<0.05)。



注:与0h组比较, * P <0.05, ** P <0.01
图3 IAV感染A549细胞后诱导产生的IFN
Fig. 3 IFNs induced by IAV infection in A549 cells



注:与0h组比较, * P <0.05, ** P <0.01
图4 IAV感染A549细胞后诱导产生的ISGs
Fig. 4 ISGs induced by IAV infection in A549 cells



注:与0h组比较, * P <0.05, ** P <0.01
图5 IAV在A549细胞中诱导产生IFN的抗病毒作用
Fig. 5 The antiviral effects of IFNs induced by IAV infection in A549 cells

讨 论

流感病毒激活的先天免疫反应是宿主重要的保护屏障,明确 IAV 感染 A549 细胞后所激活的抗病毒反应,有助于探究 IAV 与 A549 细胞的相互作用机理。本研究发现,在 IAV 感染 A549 细胞后,病毒增殖达到峰值时,其所诱导的 I 型 IFN(IFN β)和 III 型 IFN(IFN λ 1、IFN λ 2、IFN λ 3)干扰素的表达水平也同步到达最大值,但 IFN α 和 IFN γ 未被显著激活表达。与此前本课题组在 IBV 的研究中发现,在感染 MDCK 细胞后主要诱导的 I 型 IFN(IFN α 、IFN β)和 III 型 IFN(IFN λ 1、IFN λ 3)干扰素表达显著增加所不同,这可能是所使用毒株之间的差异,也可能是感染细胞的不同,但值得注意的是 IAV 与 IBV 在所诱导的干扰素反应类型有差异^[19]。因此,在针对不同的病毒感染时,有关干扰素的治疗更应该关注病原微生物之间的差异性。此外,干扰素相关的治疗方法也被考虑到用来抑制 SARS-CoV2,其中研究人员开发的 I 型和 II 型 IFN 的稳定肽模拟物具有有效的广谱抗病毒活性^[20]。II 型 IFN(IFN γ)虽然在本研究中并未有显著增强,但可能是细胞株差异所造成的,因先前有研究发现在包括流感病毒等多种病毒感染后,组织中驻留的 1 型固有淋巴样细胞(ILC1)是产生 IFN γ 的主要来源^[21]。此外,还发现 IFN γ 可以抑制 ILC2 活性并减少 IL5 的产生,从而加剧甲型 H1N1 pdm09 流感感染期间疾病的严重程度^[22]。在流感病毒感染期间,宿主 IFN γ 还被发现能够与病毒 PB1-F2 蛋白互作并调节 ILC2 和 T 细胞的功能,从而发挥抗病毒效应^[23]。因此,宿主 IFN γ 在流感病毒感染过程中同样也发挥着至关重要的作用,在特殊细胞株或者体内实验中更应该考虑 IFN γ 的差异。

研究表明,激活的 NF- κ B 协同调控 IFN 基因的表达,不仅在受感染细胞中诱导 IFN 刺激基因的表达,而且还以旁分泌方式作用于周围细胞,使机体处于抗病毒状态,从而限制病毒的传播^[24-25]。缺乏编码抑制 NF- κ B 的 A20 蛋白基因的骨髓细胞在 IAV 感染后表现出过度的 NF- κ B 激活,促进了促炎细胞因子的产生和 I 型干扰素水平的升高。然而,敲除骨髓细胞中的 A20 蛋白基因可以保护小鼠免受致命的 IAV 感染,从而表明 NF- κ B 活性增加具有抗病毒作用^[26]。本研究中 I 型干扰素水平的升高可能与 NF- κ B 的激活紧密相连。IAV 激活 NF- κ B 也有助于病毒复制和传播,在抑制 NF- κ B 的同时会影响 IAV 在宿主内的增殖^[16,27]。通过显性失活的 IKK β 突变体或不可降解的 I κ B α 突变体的表达抑制 NF- κ B 也会阻遏 A549 细胞中 IAV 复制,进一步表明激活 NF- κ B 能够促进 IAV

子代病毒的合成^[13]。本研究中 NF- κ B 的激活可能促进了 IAV 的复制。此外,也有研究报道 NF- κ B 增强 IAVPB1-F2 辅助蛋白的活性^[28]。因此,关于 NF- κ B 及其相关通路在流感病毒感染宿主过程中所发挥的作用需要科研工作者给予更多的关注。

IAV 感染 A549 细胞可诱导产生 I 型和 III 型 IFNRNA 水平的升高。此外,本研究发现,诱导产生的 IFN 具有抗病毒作用。A549 细胞内诱导产生的 ISGs 也相应升高,表明 IAV 感染 A549 细胞后分泌产生了有活性的 IFN,并通过自分泌或旁分泌形式诱导细胞产生 ISGs,同时说明这几种 ISGs 在宿主细胞抗 IAV 感染过程中起重要作用。Mx 蛋白仅在 I 型和 III 型 IFN 的控制下表达,能够通过抑制病毒基因组进入细胞核来抑制病毒转录和复制^[29-31]。这与本研究中 I 型和 III 型 IFN 高表达可能有关。CXCL10 能够被 IFN γ 在多种细胞中诱导,促进免疫细胞的趋化作用,从而促进对细胞免疫对病毒的杀伤作用^[32]。IFN γ 在本研究中未见显著促进,可能还有其他机制促进 CXCL10 的表达,这为研究 CXCL10 的激活提供参考。在 IAV 感染宿主后,IFI27 的上调主要集中在特定免疫细胞群中,如单核细胞和树突状细胞^[33]。A549 细胞中 IFI27 也显著上调,或将为抗病毒研究提供新的依据。STAT1 参与了 IFN 激活基因的调控,STAT1 的显著上升可能也促进了 I 型和 III 型 IFN 的表达^[34]。ISGs 是 IFN 介导的抗病毒反应的终极效应因子,在本研究中被显著上调以参与抗病毒反应的 ISGs,对于不同的病毒所发挥的效应可能截然不同,后续应针对特定的 ISG 进行更深入的研究,使其发挥更好的抗病毒效应。

综上所述,本研究初步揭示了 A549 细胞在 IAV 感染后所诱导的一系列抗病毒反应,激活了 NF- κ B 通路并诱导了不同水平的 IFN 和 ISGs,以及产生的 IFN 及 ISGs 发挥抗病毒活性,为今后研究不同亚型流感病毒激活不同细胞系或体内的抗病毒反应提供参考依据。

【参考文献】

- [1] Flerlage T, Boyd DF, Meliopoulos V, et al. Influenza virus and SARS-CoV-2: pathogenesis and host responses in the respiratory tract[J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(7): 425-441.
- [2] 夏胜男, 庄忻雨, 田明尧, 等. H1N1 亚型流感病毒 mRNA 候选疫苗的构建、表达及鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(3): 254-259.
- [3] Chauhan RP, Gordon ML. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates[J]. Virus Genes, 2022, 58(4): 255-269.
- [4] 高明阳, 胡欣妍, 吴玉湖, 等. 流感病毒感染中固有免疫和获得性免疫的研究进展[J]. 病毒学报, 2023, 39(4): 1142-1151.

- [5] Chen L, Xing C, Ma G, et al. N-myc downstream-regulated gene 1 facilitates influenza A virus replication by suppressing canonical NF- κ B signaling[J]. *Virus Res*, 2018, 252: 22-28.
- [6] Dam S, Kracht M, Pleschka S, et al. The influenza A virus genotype determines the antiviral function of NF- κ B[J]. *J Virol*, 2016, 90(17): 7980-7990.
- [7] Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons; cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures[J]. *J Gen Virol*, 2000(81): 2341-2364.
- [8] Ludwig S. Exploited defense: how influenza viruses take advantage of antiviral signaling responses [J]. *Future Virol*, 2007, 2(1): 91-100.
- [9] Yang E, Li M. All About the RNA: Interferon-stimulated genes that interfere with viral rna processes[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 605024.
- [10] Huang W, Lin W, Chen B, et al. NFAT and NF- κ B dynamically co-regulate TCR and CAR signaling responses in human T cells [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(7): 112663.
- [11] 杨宣叶, 胡欣妍, 高明阳, 等. CD4⁺和CD8⁺T细胞在抗流感病毒免疫中的重要作用[J]. *病毒学报*, 2024, 40(1): 206-214.
- [12] Pauli EK, Schmolke M, Wolff T, et al. Influenza A virus inhibits type I IFN signaling via NF- κ B-dependent induction of SOCS-3 expression[J]. *PLoS pathog*, 2008, 4(11): e1000196.
- [13] Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, et al. NF- κ B-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(30): 30931-30937.
- [14] Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, et al. Active NF- κ B signalling is a prerequisite for influenza virus infection [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt 8): 2347-2356.
- [15] Kumar N, Xin ZT, Liang Y, et al. NF- κ B signaling differentially regulates influenza virus RNA synthesis [J]. *J Virol*, 2008, 82(20): 9880-9889.
- [16] Kuwahara T, Yamayoshi S, Noda T, et al. G protein pathway suppressor 1 promotes influenza virus polymerase activity by activating the NF- κ B signaling pathway[J]. *mBio*, 2019, 10(6): e02867-19.
- [17] Wang X, Pu F, Yang X, et al. Immunosuppressants exert antiviral effects against influenza A (H1N1) pdm09 virus via inhibition on nucleic acid synthesis, mRNA splicing and protein stability[J]. *Virulence*, 2024: 2301242.
- [18] Ma P, Li L, Jin L, et al. Antiviral responses of ATG13 to the infection of peste des petits ruminants virus through activation of interferon response[J]. *Gene*, 2020, 754: 144858.
- [19] 蒲飞洋, 汪梦竹, 冯茜莉, 等. 乙型流感病毒感染过程中干扰素介导的天然免疫应答[J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36(4): 423-428.
- [20] Johnson HM, Ahmed CM. Disparate viral pandemics from COVID19 to monkeypox and beyond: a simple, effective and universal therapeutic approach hiding in plain sight [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1208828.
- [21] Weizman OE, Adams NM, Schuster IS, et al. ILC1 confer early host protection at initial sites of viral infection[J]. *Cell*, 2017, 171(4): 795-808. e12.
- [22] Califano D, Furuya Y, Roberts S, et al. IFN- γ increases susceptibility to influenza A infection through suppression of group II innate lymphoid cells[J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(1): 209-219.
- [23] Barman TK, Huber VC, Bonin JL, et al. Viral PB1-F2 and host IFN- γ guide ILC2 and T cell activity during influenza virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(8): e2118535119.
- [24] Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense[J]. *Immunity*, 2006, 25(3): 373-381.
- [25] Le Bon A, Tough DF. Type I interferon as a stimulus for cross-priming[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19(1): 33-40.
- [26] Maelfait J, Roose K, Bogaert P, et al. A20 (Tnfrsf3) deficiency in myeloid cells protects against influenza A virus infection[J]. *PLoS pathog*, 2012, 8(3): e1002570.
- [27] Feng M, Zhang Q, Wu W, et al. Inducible guanylate-binding protein 7 facilitates influenza A virus replication by suppressing innate immunity via NF- κ B and JAK-STAT signaling pathways [J]. *J Virol*, 2021, 95(6): e02038-20.
- [28] Le Goffic R, Leymarie O, Chevalier C, et al. Transcriptomic analysis of host immune and cell death responses associated with the influenza A virus PB1-F2 protein[J]. *PLoS pathog*, 2011, 7(8): e1002202.
- [29] Holzinger D, Jorns C, Stertz S, et al. Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling[J]. *J Virol*, 2007, 81(14): 7776-7785.
- [30] Mnz B, Dornfeld D, Gotz V, et al. Pandemic influenza A viruses escape from restriction by human MxA through adaptive mutations in the nucleoprotein[J]. *PLoS pathog*, 2013, 9(3): e1003279.
- [31] Xiao H, Killip MJ, Staeheli P, et al. The human interferon-induced MxA protein inhibits early stages of influenza A virus infection by retaining the incoming viral genome in the cytoplasm [J]. *J Virol*, 2013, 87(23): 13053-13058.
- [32] Brownell J, Bruckner J, Wagoner J, et al. Direct, interferon-independent activation of the CXCL10 promoter by NF- κ B and interferon regulatory factor 3 during hepatitis C virus infection [J]. *J Virol*, 2014, 88(3): 1582-1590.
- [33] Zhang Y, Zong L, Zheng Y, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with influenza A virus infection[J]. *iScience*, 2023, 26(12): 108507.
- [34] Wesoly J, Szwedkowska-Kulinska Z, Bluyssen HAR. STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses[J]. *Acta Biochim Pol*, 2007, 54(1): 27-38.