

李春雨, 田世茂, 孔迎迎, 等. 神经介素 B 及受体 NMBR 和 PD-L1 在 H9N2 亚型流感病毒感染过程中的相互作用研究 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (1): 65-70.

LI C Y, TIAN S M, KONG Y Y, et al. Interaction of neuromedin B and its receptor NMBR with PD-L1 during H9N2 influenza A virus infection [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (1): 65-70.

## 神经介素 B 及受体 NMBR 和 PD-L1 在 H9N2 亚型流感病毒感染过程中的相互作用研究

李春雨<sup>#</sup>, 田世茂<sup>#</sup>, 孔迎迎, 陈灿辉, 田也,  
刘莎莎, 陈吉龙, 杨桂红<sup>\*</sup>

(福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002)

**摘要:** 神经介素 B (NMB) 及其 G 蛋白偶联受体 (NMBR) 发挥的抗甲型流感病毒免疫反应, 以及甲型流感病毒感染诱导细胞程序性死亡配体 1 (PD-L1) 高表达均与 NF- $\kappa$ B 信号通路有直接关系, 而 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活受 ERK 信号通路的调控。为深入探究 NMB 与 NMBR 调节 H9N2 亚型流感病毒感染诱导 PD-L1 上的作用, 本研究以 H9N2 亚型流感病毒为模式毒株, 基于 NMBR 干扰和过表达细胞系、PD-L1 干扰和过表达细胞系以及 C57BL/6 小鼠, 采用 RT-PCR 和 Western blot 方法分析 NMB 与 NMBR 对 PD-L1 表达变化以及 ERK 磷酸化的影响。结果显示: H9N2 亚型流感病毒感染诱导的 NMBR 和 PD-L1 表达之间存在着负调控的关系, 外源性 NMB 可以有效激活小鼠体内 NMBR 的表达, 进而抑制 PD-L1 表达, NMB 与 NMBR 也能影响 H9N2 感染诱导的 ERK 磷酸化水平。综上, H9N2 亚型流感病毒感染诱导表达的 NMB 与 NMBR 通过 ERK 信号通路调节 PD-L1 的表达而发挥抗流感病毒作用, 将为深度剖析宿主-甲型流感病毒之间的互作关系提供新的科学依据。

**关键词:** 流感病毒; H9N2 亚型; 神经介素 B; 神经介素 B 受体; 细胞程序性死亡配体 1

**中图分类号:** S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)01-0065-06

## Interaction of neuromedin B and its receptor NMBR with PD-L1 during H9N2 influenza A virus infection

LI Chunyu<sup>#</sup>, TIAN Shimao<sup>#</sup>, KONG Yingying, CHEN Canhui, TIAN Ye,  
LIU Shasha, CHEN Jilong, YANG Guihong<sup>\*</sup>

(College of Animal Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** The activation of NF- $\kappa$ B signaling is regulated by the ERK signaling pathway. The antiviral immune responses of NMB and NMBR and the high expression of PD-L1 induced by influenza A virus infection are directly related to the signaling pathway of NF- $\kappa$ B. To identify the association between NMB and NMBR and PD-L1 during influenza A virus infection, H9N2 subtype was used as a model strain in this study. The effect of NMB and NMBR on the expression of PD-L1 and the phosphorylation of ERK were analyzed by RT-PCR and Western-blotting based on the effects of NMBR interference and overexpression cell lines, PD-L1 interference and overexpression cell lines, and C57BL/6 mice. The results showed that the expression of NMBR and PD-L1 induced by H9N2 subtype infection had a positive correlation with the expression of PD-L1. Moreover, exogenous NMB could effectively activate the expression of NMBR and then inhibit the expression of PD-L1; and NMB and NMBR could also directly regulate the level of ERK phosphorylation induced by H9N2 subtype infection. These results suggested that H9N2 subtype infection-induced NMB and NMBR exerted anti-influenza A virus immune response through ERK signaling pathway mediated PD-L1 expression. The results provided a theoretical basis for further understanding of host-influenza A virus interactions and a new way to screen novel anti-influenza drug targets.

**Keywords:** influenza virus; H9N2 subtype; neuromedin B; neuromedin B receptor; programmed cell death ligand/PD-L1

收稿日期: 2023-02-25; 修回日期: 2023-10-27

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (32030110); 福建省自然科学基金面上项目 (2021J01085, 2020J01539)

第一作者: 李春雨, 女, 本科生; 田世茂, 女, 硕士研究生。<sup>#</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup>通信作者: 杨桂红, 博士, 副教授, 硕导, 研究方向: 活性肽在动物病重要毒感染过程中的作用, E-mail: yangguihong@fafu.edu.cn。

甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 是困扰养殖业的一种重要的病原微生物, 属于正黏病毒科、单股负链 RNA 病毒, 根据病毒表面的 18 种血凝素 (HA) 和 11 种神经氨酸酶 (NA) 而被划分为若干亚型<sup>[1]</sup>。目前, 在我国养殖业流行的亚型主要有鸡群 H9N2<sup>[2]</sup>、犬群 H3N2<sup>[3]</sup> 以及猪群 H1N1、H1N2 和 H3N2<sup>[4]</sup>。IAV 可通过空气传播, 季节性引起人或动物急性上呼吸道感染, 造成细胞因子风暴, 诱发急性肺损伤, 导致人和大量动物的死亡, 给公共卫生健康带来严重的威胁<sup>[5]</sup>。H9N2 亚型流感病毒是家禽中的优势毒株, 并为多种亚型禽流感病毒提供基因片段<sup>[6-7]</sup>。因此, 开展 H9N2 亚型 IAV 的相关研究对公共卫生和动物健康的意义重大。

神经介素 B (neuromedin B, NMB) 是神经内分泌免疫系统中的重要生物活性肽, 可与 G 蛋白偶联受体 (NMBR) 结合发挥多种生理功能<sup>[8]</sup>。本项目组前期研究发现, NMB 与 NMBR 可以通过 NF- $\kappa$ B 信号通路发挥抗 IAV/H1N1 的先天性免疫反应<sup>[9-10]</sup>。在分析 NMB 与 NMBR 在 IAV 诱导的肺炎症损伤反应中发现, NMB 与 NMBR 发挥抗流感的作用途径与 IAV 诱导细胞程序性死亡配体 (程序性死亡配体 1, 简称 PD-L1) 介导的信号通路均为 NF- $\kappa$ B 信号通路。目前, 部分研究发现 PD-L1 参与 IAV 感染诱导的免疫调节反应。IAV 感染诱导人树突状细胞和 T 细胞上 PD-L1 的表达上升, 阻断 PD-L1 可显著降低 CD8<sup>+</sup> T 细胞凋亡并增加 CD4<sup>+</sup> T 细胞诱导的  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 10 (IL-10) 和肿瘤坏死因子 (TNF) 表达, 从而改变 IAV 的感染进程<sup>[11]</sup>。研究表明, PD-L1 对 T 细胞功能的影响主要是通过 NF- $\kappa$ B 通路实现的<sup>[12]</sup>。以上研究表明, IAV 感染诱导的 NMB 与 NMBR 信号和 PD-L1 表达之间可能存在一定的作用关系。因此, 本研究利用 H9N2 亚型流感病毒毒株感染宿主细胞, 分析 NMB 与 NMBR 和 PD-L1 之间的调节关系, 为寻找更有效的新型抗 IAV 感染药物提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 细胞与病毒

人肺腺癌细胞 (A549 细胞)、人胚肾细胞 (293T 细胞) 购买自中国科学院上海细胞库。甲型流感病毒 H9N2 亚型毒株 (A/Chicken/Fujian/MQ01/2015) 由本实验室分离、鉴定后保存。

#### 1.1.2 质粒与抗体

Package、Pvsug 和 pNL-EGFP-CMV-WPREdU3 质粒均由本实验室保存。本课题组前期使用 pNL-

EGFP-CMV-WPREdU3 载体于酶切位点 *Nhe* I 和 *Xho* I 插入 NMBR、PD-L1 片段构成 pNL-NMBR、pNL-PD-L1 重组质粒, 用于构建 NMBR 过表达细胞系 (NMBR<sup>+/+</sup>)、PD-L1 过表达细胞系 (PD-L1<sup>+/+</sup>), 并将该质粒保存于本实验室。

GAPDH 抗体 (货号: HC301-01) 购自 TransGen Biotech 公司; NMBR 抗体 (货号: ab134141)、ERK 抗体 (货号: ab184699) 均购自 Abcam 公司; pERK 抗体 (货号: #ET1603-22) 购自华安生物公司; PD-L1 抗体 (货号: #13684) 购自 Cell Signaling Technology 公司; NP 抗体由本实验室制备并保存; 鼠抗兔 (货号: 211-005-109) 二抗购自 Jackson Immunoresearch 公司。

#### 1.1.3 引物序列

使用 NCBI 数据库在线引物设计工具 Primer-BLAST 设计引物, 序列的合成在生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成, 具体信息见表 1。

表 1 RT-PCR 引物

引物名称	序列 (5'→3')	退火温度/°C	循环数
NMBR-F	CGGTATTTACCTGTGCCCT	55	35
NMBR-R	GTCCGGATCGTCTAGCATT		
GAPDH-F	AGAAGGCTGGGGCTCATTTC	55	20
GAPDH-R	AGGGCCATCCACAGTCTTC		
PD-L1-F	GTTGTGGATCCAGTCACCTCT	56	35
PD-L1-R	AATTGCTGGTGGTCTTAC		

#### 1.1.4 多肽合成

本研究中使用到的 NMB 由中国杭州专肽生物技术有限公司合成, 采用 PBS 缓冲液溶解 NMB (100  $\mu$ mol/L), 分装保存在 -80 °C 备用。

NMB 氨基酸序列: Ala-Pro-Leu-Ser-Trp-Asp-Leu-Pro-Glu-Pro-Arg-Ser-Arg-Ala-Gly-Lys-Ile-Arg-Val-His-Pro-Arg-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH<sub>2</sub>。

### 1.2 细胞培养

将 A549 细胞或 293T 细胞从 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中拿出, 弃完全培养基, PBS 清洗 2 遍; 用 0.25% 胰酶溶液消化细胞, 视细胞情况而定消化时长, A549 细胞消化 3 min, 293T 细胞消化 30 s, 待细胞变圆并轻敲后脱落即可; 用 2 mL 完全培养基吹下细胞终止消化, 各吸 1 mL 转移到 2 盘含 6 mL 完全培养基的 10 cm 培养皿中, 或各吸 166  $\mu$ L 转移到每孔含 2 mL 完全培养基的 6 孔板中, 盖上盖子摇匀, 放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。

### 1.3 NMBR 和 PD-L1 过表达细胞系的构建

取 1.5 mL EP 管配制转染试剂：A 管中加入 8  $\mu\text{g}$  重组质粒 (pNL-NMBR 或 pNL-PD-L1 或对照质粒 pNL-GFP) 和 8  $\mu\text{g}$  包装质粒 (Package 和 Pvsug)，再加入转染液至总体积为 500  $\mu\text{L}$ ，温和地混匀后静置 5 min；B 管中加入 10  $\mu\text{L}$  转染试剂 VifoFect [威格拉斯生物技术 (北京) 有限公司] 到 490  $\mu\text{L}$  转染液中，轻轻混匀后静置 5 min。轻轻混匀 A 管和 B 管试剂，室温放置 20~25 min 后，滴入到生长良好的 293T 细胞中，摇匀，37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养。4~6 h 后，换成含 8 mL 完全培养基继续培养。48 h 后，用 0.22  $\mu\text{m}$  孔径滤膜过滤上清液，加入浓度为 0.1% 的 polybrene (碧云天-C0351)，用上清液吹下提前消化好的 A549 细胞放入 6 孔板培养，每孔约 2.5 mL 病毒液。悬浮感染 120 min (2 100 r/min, 32  $^{\circ}\text{C}$ ) 后，在 6 孔板中补加 1 mL 完全培养基，然后置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  中继续培养。24 h 后进行细胞传代，利用 RT-PCR 或 Western blot 检测目的基因的过表达效果，最终可获得具有稳定过表达 NMBR (NMBR<sup>+/+</sup>) 或 PD-L1 (PD-L1<sup>+/+</sup>) 的细胞系以及对照组细胞系 (Cont)。

### 1.4 siRNA 的转染

待 A549 细胞汇合度达到 70%~80% 时更换为 Opti-MEM 培养基，将细胞分别设为 siPD-L1 和 siNMBR 转染组，同时设置平行阴性对照组 (NC)，即 siNC。转染组及其对照组各设置 3 个复孔。按 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 转染试剂盒说明书分别配置转染试剂，将配置好的转染试剂混合后孵育 15 min，然后在每孔细胞培养液中各加入 200  $\mu\text{L}$ ，轻摇混匀后置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养细胞 4~6 h，弃混合液换新鲜完全培养基，培养 24~48 h 后利用 RT-PCR 或 Western blot 检测目的基因的干扰效果后，用于后续试验。

### 1.5 H9N2 感染细胞系和小鼠

siNMBR 细胞、NMBR<sup>+/+</sup> 细胞、siPD-L1 细胞和 PD-L1<sup>+/+</sup> 细胞分别生长至 80% 后，弃完全培养基，PBS 清洗 2 次，加入 1 mL 维持液 (基础培养基+双抗+2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TPCK 胰酶)；每孔加入 H9N2 病毒 (MOI=1) 后置于培养箱吸附 1 h，每 15 min 摇 1 次；1 h 后，弃维持液，PBS 清洗 2 次，加入 2 mL 新鲜维持液，放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中，在病毒感染后设定的时间点 (感染后小时数，简称 hpi) 收取各组细胞样品。

6~8 周龄 C57BL/6 小鼠购自上海吴化实验动物，平均体重至 (18 $\pm$ 2) g/只。用挥发性麻醉药乙醚麻醉小鼠，试验组小鼠滴鼻感染 H9N2 病毒液，阴性对照组小鼠滴鼻等体积 1 $\times$ PBS，滴鼻后继续放回笼中饲

养，在病毒感染后设定的时间点用乙醚麻醉处死小鼠收取各组肺脏组织样品。

### 1.6 NMB 处理 H9N2 感染的 A549 细胞和小鼠

基于 H9N2 感染 A549 细胞，添加 100 nmol/L 外源性 NMB 作用于细胞，试验分为 4 组：①对照组，②攻毒组，③攻毒+NMB 组，④对照+NMB 组，每组重复 6 个孔。具体操作如下：将 A549 细胞预先铺在 6 孔板细胞板，待细胞的生长状态良好时，弃掉完全培养基，用 1 $\times$ PBS 缓冲液清洗细胞 2 次，①和④组加入 1 mL 维持液，②和③组加入 1 mL 维持液 (含 10  $\mu\text{L}$  病毒)，放入 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养，期间每 15 min 摇 1 次。1 h 后，弃掉 6 孔板中维持液，用 1 $\times$ PBS 缓冲液清洗细胞 2 次。①和②组加 2 mL 维持液，③和④组加入 2 mL 维持液 (含 100 nmol/L NMB)，置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养。6 h 后收取各组 RNA 样或蛋白样。

按 1.5 方法攻毒感染小鼠 12 h 后，在小鼠后腿肌肉注射 NMB，连续注射 3 d，观察小鼠感染情况与死亡情况，3 d 后乙醚麻醉处死小鼠，取肺组织进行后续试验。

### 1.7 RT-PCR

使用 NucleoZol 提取细胞 RNA，按照 NovoScript<sup>®</sup> Plus All-in-one 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix (gDNA Purge) 反转录试剂盒说明书进行反转录。RT-PCR 反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$  5 min；95 $^{\circ}\text{C}$  30 s，55~56  $^{\circ}\text{C}$  30 s，72  $^{\circ}\text{C}$  30 s，共 20~35 个循环；72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。反应结束后，取 PCR 扩增产物 10  $\mu\text{L}$  经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析目的条带。以 GAPDH 作为内参。

### 1.8 Western blot

提取上述细胞样品蛋白，用 SDS-PAGE 分离蛋白后转移到硝酸纤维素 (NC) 膜上；5% 牛奶中封闭 2 h，1 $\times$ TBS 中漂洗干净，一抗孵育 2~3 h，孵育结束后用 1 $\times$ TBS 漂洗 30 min，10 min/次；再用二抗孵育 2 h，1 $\times$ TBS 漂洗 30 min，10 min/次，将条带置于 ECL 化学发光液 (苏州新赛美生物科技公司) 后放入化学发光仪 (Tanon 5200) 曝光。

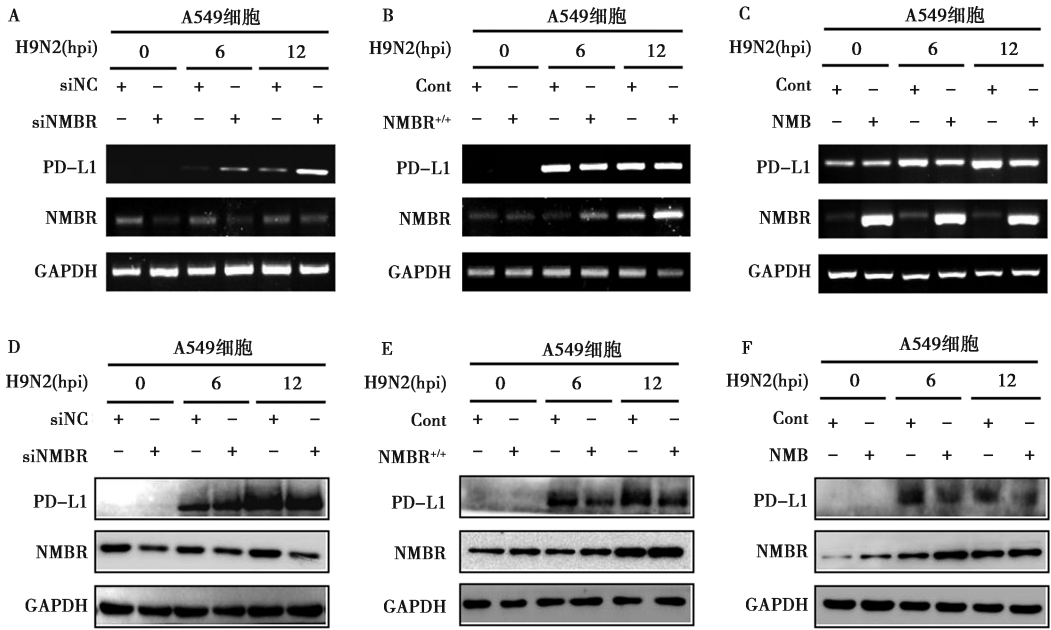
## 2 结果

### 2.1 NMB/NMBR 调节 H9N2 感染诱导的 PD-L1 表达

分别收集 H9N2 (MOI=1) 感染的 siNMBR 细胞、siNC 细胞、NMBR<sup>+/+</sup> 细胞、Cont 细胞、H9N2 感染后 NMB 处理的 A549 细胞和相应的阴性对照组的细胞于 0、6 和 12 h 的核酸样品和蛋白样品，采用 RT-PCR 和 Western blot 分别分析 PD-L1 在各组的表达变化。结果显示：siNMBR 细胞中 PD-L1 的表达水

平在感染后 6~12 h 明显升高; NMBR<sup>+/+</sup> 细胞中 PD-L1 的表达水平在感染后 6~12 h 出现了下降趋势; NMB 处理后, 不仅可以刺激 A549 细胞中 NMBR 的

表达水平上升, 还可抑制 PD-L1 的表达 (图 1)。该结果表明, NMB/NMBR 可以直接调控 H9N2 感染诱导的 PD-L1 的表达。



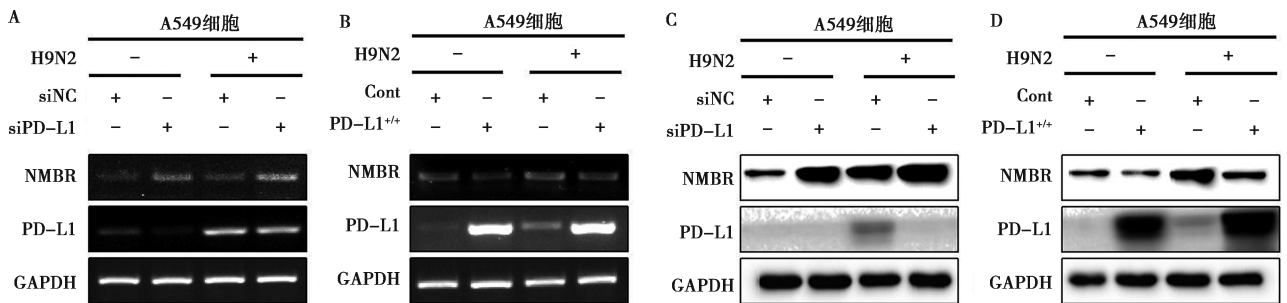
4. RT-PCR 结果显示干扰 NMBR 导致 H9N2 感染诱导的 PD-L1 表达增强; B. RT-PCR 结果显示过表达 NMBR 导致 H9N2 感染诱导的 PD-L1 表达下调; C. RT-PCR 结果显示外源性 NMB 刺激导致 H9N2 感染诱导的 PD-L1 表达下调; D. Western blot 结果显示干扰 NMBR 导致 H9N2 感染诱导的 PD-L1 表达增强; E. Western blot 结果显示过表达 NMBR 导致 H9N2 感染诱导的 PD-L1 表达下调; F. Western blot 结果显示外源性 NMB 刺激导致 H9N2 感染诱导的 PD-L1 表达下调。

图 1 H9N2 感染诱导 NMB/NMBR 调节 PD-L1 的表达

## 2.2 PD-L1 调节 H9N2 感染诱导的 NMBR 表达

分别收集上述 H9N2 (MOI = 1) 的 siPD-L1 细胞、siNC 细胞、PDL-1<sup>+/+</sup> 细胞、Cont 细胞和阴性对照组细胞于 0 和 18 h 的核酸样品和蛋白样品, 采用 RT-PCR 和 Western blot 分别分析 PD-L1 在各组细胞中的表达变化。结果如图 2 显示: H9N2 感染诱导

siPD-L1 细胞中的 NMBR 表达水平明显上升, H9N2 感染诱导 PD-L1<sup>+/+</sup> 细胞中的 NMBR 的表达水平出现明显下降趋势。该结果表明, PD-L1 也可以直接参与调控 H9N2 亚型流感病毒感染诱导的 NMBR 的表达水平。综合以上结果显示, NMBR 和 PD-L1 在 H9N2 感染过程中可能存在着相互作用的关系。



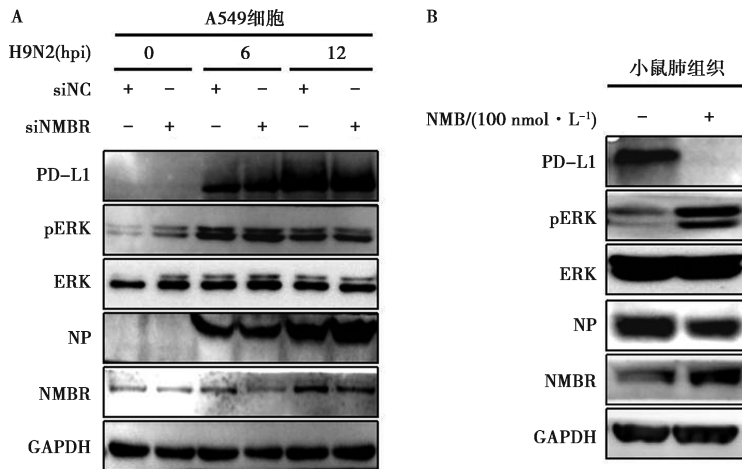
A. RT-PCR 结果显示干扰 PD-L1 导致 H9N2 感染诱导的 NMBR 表达增强; B. RT-PCR 结果显示过表达 PD-L1 导致 H9N2 感染诱导的 NMBR 表达下调; C. Western blot 结果显示干扰 PD-L1 导致 H9N2 感染诱导的 NMBR 表达增强; D. Western blot 结果显示过表达 PD-L1 导致 H9N2 感染诱导的 NMBR 表达下调。

图 2 H9N2 感染 18 h 后诱导 A549 细胞中 PD-L1 调节 NMBR 的表达

### 2.3 NMBR 通过 ERK 通路抑制 H9N2 感染诱导的 PD-L1 表达

本课题组前期发现, 甲型流感病毒感染诱导的 NMB/NMBR 抗病毒免疫反应及 PD-L1 高表达均与 NF- $\kappa$ B 信号通路有直接关系, 而 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活受 ERK 信号通路的调控。因此, 为进一步验证 H9N2 亚型感染诱导的 NMBR 和 PD-L1 的作用关系, 本试验在上述明确干扰 NMBR 诱导 PD-L1 表达显著增强的基础上, 对 ERK 的磷酸化水平进行了分析。如图 3A 所示, H9N2 感染诱导 siNMBR 细胞中的 PD-

L1 表达水平明显上升, 而 ERK 的磷酸化水平明显降低。该结果提示, 干扰 NMBR 可以有效缓解 H9N2 诱导的 ERK 磷酸化水平。同时, 用 NMB 刺激 H9N2 感染的小鼠, 观察小鼠肺组织中 ERK 磷酸化水平的变化。图 3B 显示, NMB 刺激不仅可以诱导 H9N2 感染的小鼠肺组织中 NMBR 表达, 也可以抑制 PD-L1 表达, 促进 ERK 的磷酸化水平。该结果显示, NMB 刺激 NMBR 表达进而激活 ERK 信号通路参与 H9N2 亚型感染诱导的 PD-L1 的表达。



A. 干扰 NMBR 抑制 H9N2 感染诱导的 ERK 磷酸化水平; B. 外源 NMB 刺激抑制 PD-L1 表达和 ERK 磷酸化。

图 3 NMB/NMBR 调节 H9N2 感染诱导的 ERK 磷酸化水平

## 3 讨论

IAV 感染可诱发机体快速产生细胞因子, 激活动员机体众多防御机制, 将免疫细胞募集到肺部, 改变维持肺屏障结构的完整性和蛋白分子的功能, 造成肺组织免疫病理性损伤。相对于病毒的高度变异性, 宿主的抗病毒因子比较保守, 通过稳定调控宿主的抗病毒作用达到阻止病毒入侵的目的是动物疫病防控的一种新思路<sup>[13]</sup>。鉴于 NMB 多肽活性和 NMBR 属于 G 蛋白偶联受体而具有的重要的药物靶标属性的结构特征, 以及二者在信号传导中的稳定调节作用, 课题组前期将 NMB 与 NMBR 应用于 IAV 引起的免疫防控研究, 发现其可以平衡调节 H1N1 亚型病毒 A/PR/8/1934 毒株诱导的 IL-6 和 IFN- $\alpha$  表达, 进而有效抑制该病毒复制<sup>[9-10]</sup>。本文在此基础上进一步分析了 NMB 与 NMBR 信号轴和 PD-L1 在 H9N2 感染过程中的关联性。

NF- $\kappa$ B 信号通路在 IAV 复制中发挥着双刃剑的作用<sup>[14-15]</sup>。现有的资料表明, NF- $\kappa$ B 信号通路 IAV 诱导的 NMB 与 NMBR 和 PD-L1 的表达均有密切

关联。但是, NF- $\kappa$ B 信号通路是否关联 IAV 诱导的 NMB 与 NMBR 和 PD-L1 的功能尚不明确。本研究证实, H9N2 亚型病毒感染过程中, NMB 与 NMBR 和 PD-L1 的表达存在互相调节的现象。基于 NMB 与 NMBR 抗 IAV 的免疫应答反应<sup>[12]</sup>和 PD-L1 在炎症反应中的免疫抑制作用<sup>[10]</sup>, 本研究证实 NMB 与 NMBR 可以通过调节 ERK 的磷酸化水平参与 H9N2 感染诱导的 PD-L1 的表达而发挥抗 IAV 的免疫应答反应。研究表明, NF- $\kappa$ B 信号通路的激活受 ERK 信号通路的调控<sup>[16-17]</sup>。因此, 本研究结果也间接暗示了 NF- $\kappa$ B 信号通路在 IAV 诱导的 NMB 与 NMBR 和 PD-L1 相互作用中发挥着重要作用。

综上, 本研究揭示了 H9N2 亚型流感病毒感染诱导的 NMB 与 NMBR 和 PD-L1 之间存在着相互的调节关系, 这种调节关系与 H9N2 感染激活的 ERK 信号通路密切相关。本文研究结果揭示了 NMB 与 NMBR 发挥抗 IAV 感染免疫调节作用的分子基础, 为深度剖析宿主-流感病毒之间的互作关系提供了理论基础, 也为筛选新型抗 IAV 药物的作用靶标提供了新思路。

## 参考文献:

- [1] LI Y T, LINSTER M, MENDENHALL I H, et al. Avian influenza viruses in humans: lessons from past outbreaks [J]. *Br Med Bull*, 2019, 132 (1): 81–95.
- [2] BI Y, LI J, LI S, et al. Dominant subtype switch in avian influenza viruses during 2016–2019 in China [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 5909.
- [3] JIMENEZ-BLUHM P, SEPULVEDA A, BAUMBERGER C, et al. Evidence of influenza infection in dogs and cats in central Chile [J]. *Prev Vet Med*, 2021, 191: 105349.
- [4] CUI P, ZENG X, LI X, et al. Genetic and biological characteristics of the globally circulating H5N8 avian influenza viruses and the protective efficacy offered by the poultry vaccine currently used in China [J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65 (4): 795–808.
- [5] ZHU Y, HAN Q, WANG L, et al. Jinhua Qinggan granules attenuates acute lung injury by promotion of neutrophil apoptosis and inhibition of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115763.
- [6] WASIK B R, VOORHEES I E H, PARRISH C R. Canine and feline influenza [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2021, 11 (1): a038562.
- [7] SUN Y, LIU J. H9N2 influenza virus in China: a cause of concern [J]. *Protein Cell*, 2015, 6 (1): 18–25.
- [8] BI Y, CHEN Q, WANG Q, et al. Evolution and prevalence of H5N6 avian influenza viruses in China [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 20 (6): 810–821.
- [9] KAMEDA H, MIYOSHI H, SHIMIZU C, et al. Expression and regulation of neuromedin B in pituitary corticotrophs of male melanocortin 2 receptor-deficient mice [J]. *Endocrinology*, 2014, 155 (7): 2492–2499.
- [10] VALERO-PACHECO N, ARRIAGA – PIZANO L, FERAT – OSORIO E, et al. PD-L1 expression induced by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus impairs the human T cell response [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013, 2013: 989673.
- [11] HAN Y, LIU D, LI L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10 (3): 727–742.
- [12] BAILLIE J K, DIGARD P. Influenza—time to target the host? [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (2): 191–193.
- [13] YANG G, HUANG H, TANG M, et al. Role of neuromedin B and its receptor in the innate immune responses against influenza A virus infection *in vitro* and *in vivo* [J]. *Veterinary Research*, 2019, 50 (1): 80.
- [14] ARTERO – CASTRO A, CALLEJAS F B, CASTELLVI J, et al. Cold – inducible RNA – binding protein bypasses replicative senescence in primary cells through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29 (7): 1855–1868.
- [15] MA S Q, WEI H L, ZHANG X. TLR2 regulates allergic airway inflammation through NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in asthmatic mice [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 (10): 3138–3146.
- [16] AN Y, ZHANG H, WANG C, et al. Activation of ROS/MAPKs/NF- $\kappa$ B/NLRP3 and inhibition of efferocytosis in osteoclast – mediated diabetic osteoporosis [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (11): 12515–12527.
- [17] WANG L, WANG L, ZHANG H, et al. AREG mediates the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells via the EGFR/ERK/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2020, 43 (5): 1558–1568.