

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.08.003

❖ 基础研究 ❖

# 蛋白酶激活受体 1 在甲型流感病毒感染所致炎症中的作用机制

高蕊<sup>1</sup>, 杨亚荣<sup>1</sup>, 袁娟<sup>1</sup>, 潘建丽<sup>2</sup>

(西安市儿童医院, 1. 感染门诊; 2. 特需病区, 陕西 西安 710003)

**【摘要】目的:** 探究蛋白酶激活受体 1 (PAR1) 在甲型流感病毒 (IAV) 感染所致的炎症中的作用机制。**方法:** 选取 10 例甲型流感病毒患者及 10 名健康受试者作为研究对象, 比较二者血清 PAR1 表达水平。按照不同感染复数将人肺癌细胞系 A549 细胞分为 control 组、0.05 组、0.1 组、0.2 组及 0.4 组, 使用 MTT 法检测各组细胞活性; 使用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测各组白细胞介素 6 (IL-6) 水平; 使用 RT-qPCR 检测各组 PAR1 mRNA 水平; Western blot 检测 PAR1、Toll 样受体 3 (TLR3) 及核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 蛋白水平。敲低 PAR1 或过表达 TLR3 后, 使用 Western blot 检测各组细胞 PAR1、TLR3、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达量。**结果:** PAR1 在 IAV 感染患者血清及 IAV 感染的 A549 细胞中表达上调。与 control 组细胞相比, IAV 感染细胞中细胞活性降低, 促炎因子 IL-6 水平升高, 且 PAR1 的 mRNA 表达水平上调。si-PAR1 抑制了 IAV 诱导的炎症细胞因子 IL-6 水平的升高。TLR3 过表达逆转了由 si-PAR1 所致的 TLR3、p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ )。TLR3 过表达逆转了 si-PAR1 所致的细胞活力和炎症因子的水平 ( $P < 0.05$ )。si-PAR1 通过介导 TLR3/NF- $\kappa$ B 信号通路降低 IAV 感染所致的炎症反应。**结论:** 敲低 PAR1 可通过抑制 TLR3/NF- $\kappa$ B 信号通路降低了 IAV 感染所致的炎症反应, 发挥抗病毒作用。

**【关键词】** 甲型流感病毒; 蛋白酶激活受体 1; TLR3/NF- $\kappa$ B; 炎症

**【中图分类号】** R373.1; R511; R363.1 **【文献标志码】** A

## The role and mechanism of PAR1 in the inflammation caused by IAV infection

GAO Rui<sup>1</sup>, YANG Ya-rong<sup>1</sup>, YUAN Juan<sup>1</sup>, PAN Jian-li<sup>2</sup>

(1. Outpatient of Infectious Diseases; 2. Special Department, Xi'an Children's Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the role and mechanism of protease activated receptor 1 (PAR1) in inflammation caused by influenza A virus (IAV) infection. **Methods:** 10 patients with IAV and 10 healthy subjects were selected as the research objects, and the serum PAR1 expression levels were compared between them. Human lung cancer cell line A549 cells were divided into control group, 0.05 group, 0.1 group, 0.2 group, and 0.4 group according to different infection multiples. Cell activity in each group was detected using MTT method. The interleukin-6 (IL-6) levels in each group was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), RT-qPCR was used to detect the mRNA expression level of PAR1. Western blot was used to detect the expression level of PAR1, TLR3, and NF- $\kappa$ B p65. After knocking down PAR1 or overexpressing TLR3, Western blot was used to detect PAR1, TLR3, and NF- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65 protein expression level in each groups. **Results:** PAR1 was up-regulated in the serum of patients infected and A549 cells infected with IAV. Compared with the cells of the control group, IAV infected cells showed decreased cell activity, increased levels of pro-inflammatory factor IL-6, and up-regulated mRNA expression levels of PAR1. si-PAR1 inhibited the elevation of inflammatory cytokine IL-6 levels induced by IAV. Overexpression of TLR3 reversed the decrease of protein level of TLR3, p-NF- $\kappa$ B p65 caused by si-PAR1 ( $P < 0.05$ ), overexpression of TLR3 also reversed the cell viability and inflammatory factor levels caused by si-PAR1 ( $P < 0.05$ ). si-PAR1 mediated the TLR3/NF- $\kappa$ B signaling pathway to reduce the inflammatory response caused by IAV infection. **Conclusion:** Knockdown of PAR1 reduced the inflammatory response caused by IAV infection via inhibiting the TLR3/NF- $\kappa$ B signaling pathway and exerted an antiviral effect.

**【Key words】** Influenza A virus; Protease activated receptor 1; TLR3/NF- $\kappa$ B; Inflammation

甲型流感是一种由甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 引发的急性病毒性呼吸道疾病。IAV 感染多见于呼吸道上皮, 能够与宿主细胞表面的唾液

酸糖链受体结合, 使病毒内化至宿主上皮细胞内体<sup>[1]</sup>, 导致肺上皮细胞损伤并最终导致气体交换失败, 从而引发急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory

distress syndrome, ARDS), 甚至死亡<sup>[2]</sup>。IAV 感染好发于儿童、老人和慢性病患者, 尤其是儿童<sup>[3]</sup>。

免疫系统的先天性和适应性成分被激活是抵御 IAV 等病毒感染的有效策略。然而, 过度炎症也可能诱发肺损伤, 限制呼吸能力, 可能参与人类 IAV 的发病机制<sup>[4]</sup>。蛋白酶激活受体 1 (protease activated receptor 1, PAR1) 作为一种 G 蛋白偶联受体, 在机体的免疫反应和病毒感染中发挥重要作用。既往研究<sup>[5]</sup>表明, 给予 PAR1 拮抗剂抑制了 IAV 感染小鼠的肺部炎症与早期病毒复制。本研究拟探讨 PAR1 在 IAV 感染所致的炎症中可能的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人肺癌细胞系 A549 (中国科学院细胞库); 甲型流感病毒株 A/WSN/33 (ATCC); Trizol 试剂 (in-vitrogen); 逆转录酶试剂盒 (北京索莱宝生物科技有限公司); SYBR-green 试剂盒 (Roche); RIPA 裂解液 (北京索莱宝生物科技有限公司); BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术公司); 白细胞介素 6 (interleukin 6, IL-6) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技有限公司); PAR1 抗体 (Abcam); Toll 样受体 3 (TLR3) 抗体 (Abcam); 核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 抗体 (Abcam)。

### 1.2 方法

1.2.1 患者样品的采集 选取 10 例甲型流感病毒患者和 10 名健康受试者作为研究对象, 收集新鲜血液。样本采集地点在儿童医院。所有对象本人或其家属均在样本获取前提供了书面知情同意书。

1.2.2 流感体外模型的建立 A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养进行细胞复苏和传代培养。A549 细胞用不同感染复数 (MOI) (0.05、0.1、0.2 和 0.4) 的甲型流感病毒株处理, 建立甲型流感病毒诱导 A549 细胞炎症模型。

1.2.3 细胞转染 将经甲型流感病毒株处理后的 A549 细胞接种至 6 孔板中, 达到 70% 汇合率即可进行转染。功能探究实验中的分组为: 未处理组 (control 组)、IAV 处理但未转染组 (IAV 组)、IAV 处理并转染 si-RNA 组 (IAV + si-NC 组)、IAV 处理并转染 si-PAR1 组 (IAV + si-PAR1 组)。将 si-PAR1 (CGG UCU GUU AUG UGU CUA) 或 si-RNA (CAA TCT CGA CTA TAC CCA) 分别转染至经甲型流感病毒株处理后的 A549 细胞中。机制研究实验中的分组为: IAV 处理但未转染组 (IAV 组)、IAV 处理并转

染 si-PAR1 组 (IAV + si-PAR1 组)、IAV 处理并转染 pcDNA3.1-TLR3 组 (IAV + pcDNA3.1-TLR3 组)、IAV 处理并转染 si-PAR1 和 pcDNA3.1-TLR3 组 (IAV + si-PAR1 + pcDNA3.1-TLR3 组)。将 si-PAR1 和 pcDNA3.1-TLR3 共转染至经甲型流感病毒株处理后的 A549 细胞中。具体操作如下: 将 si-PAR1、si-RNA、si-PAR1 和 pcDNA3.1-TLR3 分别与 Lipofectamine™3000 混合, 室温孵育 15 min, 随后将混合液加到细胞培养基中, 转染细胞, 37 °C 条件下继续培养 24 h。用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 清洗细胞, 加入稀释病毒液, 37 °C 孵育 1 h 后除去多余病毒, 在培养箱中继续培养 24 h。

1.2.4 细胞活力测定 将 A549 细胞 ( $1 \times 10^4$  个/孔) 接种于 96 孔培养板中, 用不同 MOI (0.05、0.1、0.2 和 0.4) 的甲型流感病毒株处理 24 h。然后在避光条件下用 0.5 mg/mL MTT 试剂继续孵育细胞 2 h, 孵育结束后向每孔加入 200  $\mu$ L 二甲基亚砷 (DMSO)。使用酶标仪 (Thermo Fisher) 在 570 nm 处测量各孔的吸光度值, 每次检测重复 3 次。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 使用实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 检测 PAR1 在细胞中的 mRNA 水平。使用 Trizol 试剂从 A549 细胞中提取总 RNA。特定引物 (TGA CAG CTA GCA CAG AGT) 和逆转录酶试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR-green 试剂盒定量基因的表达。相对 mRNA 表达水平通过 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法进行计算。各引物序列分别为: PAR1: F 5'-CCT ATG AGA CAG CCA GAA TC-3', R 5'-GCT TCT TGA CCT TCA TCC-3'; GAPDH: F 5'-GGA GTC AAC GGA TTT GGT CGT A-3', R 5'-CAA CAA TAT CCA CTT TAC CAG AGT TA-3'。

1.2.6 Western blot 细胞培养结束后收集各组细胞, 用 RIPA 裂解液裂解 A549 细胞, 并采用 BCA 法检测蛋白浓度。对蛋白质进行变性并将蛋白样品上样到 10% 的 SDS-PAGE 凝胶上。对蛋白进行电泳、转膜并用 5% 脱脂奶粉封闭。在 4 °C 条件下使用一抗封闭聚偏二氟乙烯膜过夜, 用二抗室温封闭 2 h。使用增强型化学发光试剂曝光 X 射线胶片上荧光强度。使用 ImageJ 分析系统量化条带灰度值。

1.2.7 酶联免疫吸附试验 炎症细胞因子 IL-6 的含量测定采用 ELISA 试剂盒完成。具体步骤按照造商说明书完成。每组实验结果均独立测量 3 次。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较使用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用

LSP-*t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PAR1 在 IAV 患者血清中的表达

IAV 患者中 PAR1 的 mRNA 水平高于健康受试者 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

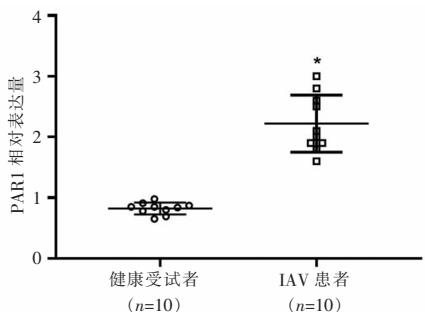


图 1 健康受试者与 IAV 患者血清中 PAR1 的 mRNA 表达水平

\* $P < 0.05$ , 与健康受试者比较。

### 2.2 PAR1 在 IAV 感染的 A549 细胞中的表达

与 control 组细胞相比,不同 IAV MOI 细胞中细胞活性均降低;PAR1 mRNA 表达水平均上调;0.1、0.2、0.4 组细胞 IL-6 水平均升高 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

### 2.3 PAR1 的敲低对 A549 细胞中炎症反应的影响

敲低 PAR1 后,PAR1 的 mRNA 及蛋白表达水平均降低 ( $P < 0.05$ )。与 si-RNA 组相比,si-PAR1 组 IL-6 水平降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

### 2.4 PAR1 对 A549 细胞中 TLR3/NF- $\kappa$ B p65 信号通路的影响

敲低 PAR1 降低了 TLR3、p-NF- $\kappa$ B p65 的蛋白表达水平。过表达 TLR3 逆转了由 si-PAR1 所致的 TLR3、p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平降低 ( $P < 0.05$ )。过表达 TLR3 还逆转了 si-PAR1 所致的细胞活性和炎症因子的水平降低 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

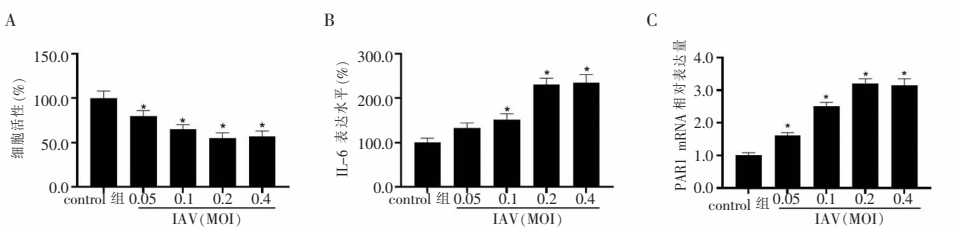


图 2 PAR1 在 IAV 感染的 A549 细胞中的表达

A. 各组细胞活力比较;B. 各组 IL-6 水平比较;C. 各组 PAR1 mRNA 水平比较。\* $P < 0.05$ ,与 control 组比较。

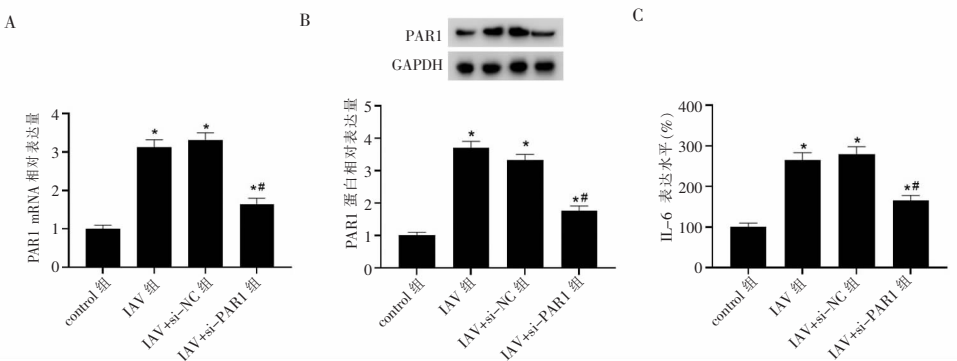


图 3 低表达 PAR1 对 A549 细胞中炎症反应的影响

A. 各组 PAR1 mRNA 表达水平比较;B. 各组 PAR1 蛋白表达水平比较;C. 各组 IL-6 水平比较。\* $P < 0.05$ ,与 control 组比较;# $P < 0.05$ ,与 IAV+si-NC 组比较。

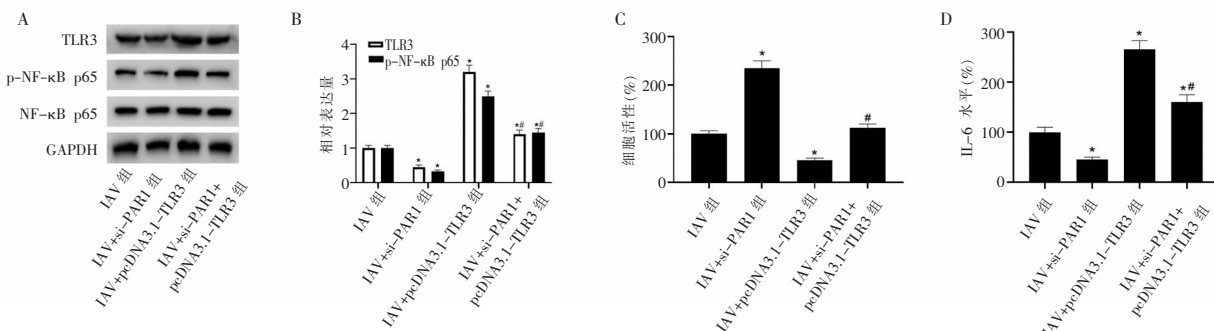


图 4 PAR1 对 A549 细胞中 TLR3/NF- $\kappa$ B p65 信号通路的影响

A-B. 各组 TLR3、NF- $\kappa$ B p65、p-NF- $\kappa$ B p65 的蛋白表达水平比较;C. 各组细胞活性比较;D. 各组 IL-6 水平比较。\* $P < 0.05$ ,与 IAV 组比较;# $P < 0.05$ ,与 IAV+si-PAR1 组比较。

### 3 讨论

作为生物体抵御入侵病原体的关键步骤,宿主免疫反应与 IAV 之间的相互作用决定了感染的结果<sup>[6]</sup>。IAV 感染通常以炎症反应为特征,并伴随细胞因子、趋化因子和急性期反应物的高水平表达<sup>[7]</sup>。在健康个体中,IAV 感染轻微,引发的促炎和抗炎反应相对平衡。当发生严重感染时,细胞因子和趋化因子反应强度和动力学失调,导致炎症免疫细胞浸润,造成呼吸上皮过度损伤<sup>[8]</sup>。呼吸道上皮的炎症反应机制可能有助于理解 IAV 的发病机制<sup>[9]</sup>。PAR1 是一种参与多种免疫反应和病毒感染的 G 蛋白偶联受体,并在肺部的感染中发挥重要作用。已有研究<sup>[10]</sup>表明,抑制 PAR1 保护小鼠免受呼吸道合胞病毒和人类偏肺病毒感染。此外,PAR1 信号传导会影响早期中性粒细胞炎症及破坏急性肺部炎症模型中的肺泡-毛细血管屏障<sup>[11]</sup>,可加重小鼠 IAV 感染后的炎症反应,增加了 IAV 的致病性<sup>[4]</sup>。因此,低表达 PAR1 可能是降低 IAV 感染的一种有效策略。本研究表明,PAR1 在 IAV 感染患者血清及病毒感染细胞模型中高表达,si-PAR1 抑制了 IAV 感染引起的炎症细胞因子 IL-6 含量的升高,敲低 PAR1 可促进 IAV 感染细胞发生细胞凋亡,发挥抗病毒作用。

流感的发病率与炎症细胞因子的失调密切相关,流感病毒感染的高死亡率可能是炎症反应过度活跃的结果<sup>[12]</sup>。TLR3 参与 IAV 感染,IAV 通过激活 TLR3 促进炎症细胞因子和趋化因子的释放<sup>[13-14]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号通路是控制病毒感染过程中炎性细胞因子分泌和炎性细胞募集的关键因素,NF- $\kappa$ B 低表达可抑制流感病毒<sup>[15]</sup>。PAR1 可通过激活 TLR3 调节 IFN- $\beta$  和 CXCL10 的表达,从而参与病毒性心肌炎的进展<sup>[16]</sup>。本研究中,si-PAR1 通过抑制 TLR3/NF- $\kappa$ B 信号通路降低 IAV 感染期间的炎症反应,即 PAR1 可能通过调节 TLR3 信号传导影响宿主对病毒感染的反应。

综上,PAR1 在 IAV 感染患者血清及病毒感染的 A549 细胞中高表达,低表达的 PAR1 可通过抑制 TLR3/NF- $\kappa$ B 信号通路降低了 IAV 感染所致的炎症反应。

#### 参考文献

[1] Hsu ACY. Influenza virus: a master tactician in innate immune evasion and novel therapeutic interventions[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 743.

- [2] Chen X, Liu S, Goraya MU, *et al.* Host immune response to influenza A virus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 320.
- [3] Coates BM, Staricha KL, Wiese KM, *et al.* Influenza A virus infection, innate immunity, and childhood[J]. *JAMA Pediatrics*, 2015, 169(10): 956-963.
- [4] Khoufache K, Berri F, Nacken W, *et al.* PAR1 contributes to influenza A virus pathogenicity in mice[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(1): 206-214.
- [5] Lina B, Riteau B. Antagonistes de PAR1[J]. *Medecine*, 2013, 29(1): 107-109.
- [6] Wu W, Zhang W, Duggan ES, *et al.* RIG-I and TLR3 are both required for maximum interferon induction by influenza virus in human lung alveolar epithelial cells[J]. *Virology*, 2015, 482: 181-188.
- [7] Kash JC, Taubenberger JK. The role of viral, host, and secondary bacterial factors in influenza pathogenesis[J]. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(6): 1528-1536.
- [8] Elbahesh H, Gerlach T, Saletti G, *et al.* Response modifiers: tweaking the immune response against influenza A virus[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 809.
- [9] Lee S, Hirohama M, Noguchi M, *et al.* Influenza A virus infection triggers pyroptosis and apoptosis of respiratory epithelial cells through the type I interferon signaling pathway in a mutually exclusive manner[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(14): e00396-e00318.
- [10] Lê VB, Riteau B, Alessi MC, *et al.* Protease-activated receptor 1 inhibition protects mice against thrombin-dependent respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(2): 388-403.
- [11] Mercer PF, Williams AE, Scotton CJ, *et al.* Proteinase-activated receptor-1, CCL2, and CCL7 regulate acute neutrophilic lung inflammation[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2014, 50(1): 144-157.
- [12] Chandler JD, Hu X, Ko EJ, *et al.* Metabolic pathways of lung inflammation revealed by high-resolution metabolomics (HRM) of H1N1 influenza virus infection in mice[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2016, 311(5): R906-R916.
- [13] Meng D, Huo C, Wang M, *et al.* Influenza A viruses replicate productively in mouse mastocytoma cells (P815) and trigger pro-inflammatory cytokine and chemokine production through TLR3 signaling pathway[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 7: 2130.
- [14] Malik G, Zhou Y. Innate immune sensing of influenza A virus[J]. *Viruses*, 2020, 12(7): 755.
- [15] Melnichuk N, Kashuba V, Rybalko S, *et al.* Complexes of oligoribonucleotides with d-mannitol modulate the innate immune response to influenza A virus H1N1 (A/FM/1/47) in vivo[J]. *Pharmaceuticals*, 2018, 11(3): 73.
- [16] Antoniak S, Mackman N. Multiple roles of the coagulation protease cascade during virus infection[J]. *Blood*, 2014, 123(17): 2605-2613.

(收稿日期: 2022-12-10)

修回日期: 2023-03-12)