



分类号: R373.1

学号: 2021110487

重 庆 医 科 大 学

硕 士 学 位 论 文

(学术学位)

论文题目 IL-1 β 对人偏肺病毒感染的作用及机制研究

作者姓名 吴国瑾

指导教师姓名 (职称、单位名称) 赵耀 研究员
重庆医科大学附属儿童医院

一级学科名称 临床医学

二级学科名称 临床检验诊断学

论文答辩年月 2024 年 5 月

目 录

前言	5
第一部分 IL-1 β 促进人偏肺病毒的感染	7
1 材料与方法	8
2 结果	17
3 讨论	26
4 小结	27
第二部分 IL-1 β 通过 c GAS-STING 调控人偏肺病毒感染的机制研究	28
1 材料与方法	29
2 结果	32
3 讨论	41
4 小结	43
研究的不足之处	44
全文总结	45
参考文献	46
文献综述 IL-1 β 在病毒感染中的研究现状	51
参考文献	57

英汉缩略语名词对照

英文缩写	英文全称	中文全称
hMPV	Human metapneumovirus	人偏肺病毒
IL-1 β	Interleukin-1 β	白细胞介素-1 β
16HBE	Human bronchial epithelioid cells	人支气管上皮细胞
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase	环GMP-AMP合成酶
STING	Interferon stimulating factor	干扰素刺激基因
siRNA	Small interfering RNA	小干扰RNA
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	杜氏改良伊戈尔培养基
Vero-E6	African green monkey kidney cells	非洲绿猴肾细胞
PBS	Phosphate buffer solution	磷酸盐缓冲液
cDNA	Complementary deoxynucleic acid	互补脱氧核糖核酸
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR	实时荧光定量PCR
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
WB	Western Blot	蛋白质印迹
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏氟乙烯
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide	聚丙烯酰胺凝胶电泳
BCA	Bicinchoninic acid	聚氰基丙烯酸正丁酯
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
IF	Immunofluorescence	免疫荧光
MFI	Mean fluorescence intensity	平均荧光强度
mtDNA	Mitochondrial DNA	线粒体DNA

rhL-1 β	Recombinant human interleukin-1 β	重组人白细胞介素-1 β
ml	Milliliter	毫升
ul	Microliter	微升
h	Hour	小时
min	Minute	分钟
um	Micron	微米
RSV	Respiratory Syncytial Virus	呼吸道合胞病毒
HIV	Human Immunodeficiency Virus	人类免疫缺陷病毒
HBV	Hepatitis B Virus	乙型肝炎病毒
HDV	Hepatitis D Virus	丁型肝炎病毒
WNV	West Nile Virus	西尼罗病毒
DENV	Dengue Virus	登革热病毒
RABV	Rabies Virus	狂犬病病毒

IL-1 β 对人偏肺病毒感染的作用及机制研究

摘要

2019 年新型冠状病毒的爆发给人类健康带来了巨大威胁，严重影响了社会经济和人们日常生活。这一全球性事件揭示了我们对呼吸道病毒的理解和研究仍然不足。其中，人偏肺病毒（hMPV）作为呼吸道病毒家族中的一员，其研究的重要性愈发凸显。这种病毒常常悄无声息地侵袭着人类的呼吸系统，尤其在儿童、老年人和免疫功能低下的人群中，其致病力更为显著。由于其传播途径多样、感染症状隐匿，hMPV往往能够在人群中悄然传播，给公共卫生安全带来潜在威胁。100%儿童在 5 岁前都感染过人偏肺病毒，已成为一种重要的全球性病原体。然而目前尚无特定的抗病毒药物来治疗hMPV感染。近年来细胞因子尤其是IL-1 β 在病毒感染领域受到了相当大的关注，有临床研究发现hMPV感染患儿IL-1 β 水平明显高于健康儿童，且IL-1 β 水平的升高较另一常见的呼吸道病毒RSV更为显著。多项研究表明IL-1 β 与病毒的复制相关。研究发现hMPV感染的IL-1 β -/-敲基因小鼠的死亡率低于感染的野生型小鼠，然而IL-1 β 是否影响hMPV复制尚不清楚。在本研究中，我们探讨了IL-1 β 对hMPV感染的影响，并探讨了其具体的作用机制。

关键词：人偏肺病毒，IL-1 β ，病毒感染

INTERACTION OF IL-1 β WITH hMPV INFECTION AND ITS MECHANISM STUDY

ABSTRACT

Background: The outbreak of the novel coronavirus in 2019 has had a significant impact on human health, as well as the economy and daily life. This global event highlighted the inadequacy of our understanding and research on respiratory viruses. As a member of the respiratory virus family, hMPV has become increasingly important to study. hMPV is a virus that attacks the respiratory system, especially in children, the elderly, and immunocompromised people. Since all children are infected by the age of five, hMPV has become a significant global pathogen. Due to its diverse transmission routes and subtle infection symptoms, hMPV can silently spread in the population, posing a potential threat to public health security. However, there are currently no specific antiviral drugs to treat hMPV infection. In recent years, IL-1 β has received considerable attention in the field of viral infection. Clinical studies have found that the level of IL-1 β in children infected with hMPV is significantly higher than that in healthy children. The increase in IL-1 β level is more significant than that of RSV. Multiple studies have shown that IL-1 β is associated with viral replication. The study found that hMPV-infected IL-1 β -/- knockout mice had lower mortality than infected wild-type mice. However, whether IL-1 β affected hMPV replication was unclear. In this study, we investigated the effect of IL-1 β on hMPV infection and explored its specific mechanism of action.

Keywords: human metapneumovirus, IL-1 β , virus infection

IL-1 β 对人偏肺病毒感染的作用及机制研究

前言

人偏肺病毒（hMPV）是一种包膜的负义单链RNA病毒，是急性呼吸道感染的主要病原之一，可引起上呼吸道或下气道感染^[1]。hMPV感染的临床症状，如咳嗽、发烧、喉咙痛等与其他呼吸道病毒引起的症状相似^[2-4]。在婴幼儿、老年人和免疫功能低下者等易感人群中，hMPV可致支气管炎和肺炎等严重疾病，是高危年龄患者住院和经济负担的主要原因^[5]。其在全球范围内呈现季节性流行趋势，主要发生在每年2到4月份，高峰通常在3月份。近几年来，hMPV在美国的检出率出现了明显的高峰，引起了国际社会的广泛关注。在某些地区，hMPV感染的发病率甚至高达43%^[6]。然而，目前没有抗病毒药物或疫苗可用于治疗或预防hMPV感染。

近年来，随着对呼吸道病毒感染和IL-1 β 研究的深入，越来越多的研究开始关注IL-1 β 在呼吸道病毒感染中的作用机制。IL-1 β 在呼吸道病毒感染中诱导的信号通路是一个复杂且精细的过程，涉及多个步骤和组件的相互作用，这个过程对于机体抵御病毒感染、启动和调控免疫反应具有重要意义。cGAS-STING信号通路在病毒感染中扮演着重要的角色，而IL-1 β 作为炎症反应的关键分子，与cGAS-STING信号通路之间的关联逐渐受到关注。IL-1 β 可以激活环鸟苷单磷酸（GMP）-AMP合成酶（cGAS）和干扰素基因（STING）途径的刺激物，指导有效的先天免疫反应，限制病原体感染^[7]。这一途径是病毒检测与宿主免疫防御机制之间的

关键纽带^[8, 9]。越来越多的证据表明, 该通路在RNA病毒中发挥着重要作用^[10-12]。

然而, IL-1 β 在病毒复制中的作用仍然存在争议^[13]。不同病毒感染模型和细胞类型之间可能存在差异, 需要我们进一步深入研究以揭示它们之间的确切关系。然而, 目前关于IL-1 β 与cGAS-STING信号通路之间的具体作用机制和调控关系仍不清楚。

在本研究中, 我们旨在探讨IL-1 β 与hMPV感染的相互作用并阐述其作用机制。

第一部分 IL-1 β 促进人偏肺病毒的感染

人偏肺病毒是 2001 年新发现的一种呼吸道病原体。这种病毒具有较强的传染性，主要通过呼吸道飞沫传播，轻症患者主要累及上呼吸道，一般会持续 1 周左右，临床表现为鼻塞、咳嗽等；重症患者可累及下呼吸道，发展为支气管炎、肺炎等病症，临床表现为发热、气促、喘息、呼吸困难等症状^[14]。它是一种能够引起各年龄段人群感染的呼吸道病毒，多表现为轻度自限性疾病，但在免疫功能低下的人群中，感染可能会进展为重症肺炎、多器官功能衰竭，甚至导致死亡^[15]。值得一提的是，随着 2019 年新冠疫情的爆发，人们对 hMPV 等呼吸道病毒的认识和重视程度进一步提高，国内外对 hMPV 的研究不断取得新的进展。

IL-1 β ，作为炎症细胞因子家族的一员，在机体应对病原感染和损伤时扮演重要的角色^[16]。当病毒侵入人体时，IL-1 β 的表达和释放会受到严格的调控，以应对感染。IL-1 β 的释放涉及一系列复杂的步骤，包括无活性前体的产生、前体的成熟活化以及活化蛋白向胞外的分泌。在病毒感染过程中，病原相关分子模式（PAMPs）和损伤相关的分子模式（DAMPs）会刺激这一过程。这些分子模式通过激活细胞膜上的 Toll 样受体（TLR）和胞内 Nod 样受体（NLR），从而诱导 IL-1 β 的释放^[17]。IL-1 β 在病毒感染中的作用是多方面的。研究发现，某些病毒如乙型肝炎病毒（HBV）可以通过调控 IL-1 β 的表达和分泌来影响其自身的复制和感染过程^[18]。然而，IL-1 β 发挥的作用在 hMPV 感染中尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与设备

设备名称	生产公司
-80℃超低温冰箱	美国Thermo Fisher Scientific
-20℃/4℃冰箱	青岛海尔集团
恒温水浴锅	英国GRANT
生物安全柜	美国Thermo Fisher Scientific
CO ₂ 培养箱	美国Thermo Fisher Scientific
超速离心机	美国Bio-Rad
微量核酸蛋白检测仪	美国Thermo Fisher Scientific
Real-time PCR仪	美国Bio-Rad
普通光学显微镜	日本Nikon
Countstar 细胞计数仪	睿钰生物科技有限公司
酶标仪	美国Bio-Tek
红外激光成像仪	美国LI COR
激光共聚焦扫描显微镜	日本Nikon
制冰机	江苏雪科电器有限公司
超纯水系统	德国Merek Millipore
磁力搅拌器	德国IKA
小型台式涡旋仪	德国Eppendorf
小型台式高速离心机	德国Eppendorf
金属锅	杭州奥盛仪器有限公司

1.1.2 主要试剂

试剂名称	生产公司
DMEM液体培养基	美国Gibco
青链霉素抗生素	苏州新赛美生物科技有限公司
胰酶	苏州新赛美生物科技有限公司
FBS	美国NTC
PBS(磷酸盐缓冲溶液)	北京鼎国昌盛生物技术有限公司
细胞冻存液	苏州新赛美生物科技有限公司
RNA提取试剂盒	广州美基生物科技有限公司
逆转录试剂盒	武汉爱博泰克生物科技有限公司
SYBR Green Dye	武汉爱博泰克生物科技有限公司
PAGE凝胶快速制备试剂盒	上海雅酶生物医药科技有限公司
蛋白maker	北京博奥龙生物有限公司
Quickblock TM Western封闭液	苏州新赛美生物科技有限公司
Western一抗稀释液	上海碧云天生物技术有限公司
超敏ECL化学发光底物	苏州新赛美生物科技有限公司
Glycine	美国Genview
Tris	美国Genview
SDS	美国Genview
TBS粉末	武汉赛维尔生物科技有限公司
Tween 20	上海碧云天生物技术有限公司
Lipofectamine 8000	上海碧云天生物技术有限公司
Recombinant IL-1 β	近岸蛋白生物有限公司
GAPDH抗体	杭州华安生物技术有限公司
IL-1 β 抗体	杭州华安生物技术有限公司
hMPV抗体	美国 Abcam

驴抗小鼠IgG H&L(HRP)	美国Abcam
HRP标记的山羊抗兔IgG	美国CST
4%多聚甲醛	上海碧云天生物技术有限公司
Quickblock™免疫染色封片剂	上海碧云天生物技术有限公司
Quickblock™免疫染色一抗稀释液	上海碧云天生物技术有限公司
Quickblock™免疫染色二抗稀释液	上海碧云天生物技术有限公司
抗荧光淬灭剂封片	上海碧云天生物技术有限公司
山羊抗小鼠IgG H&L Alexa Fluor 488	美国Abcam
DMSO	美国Sigma-Aldrich
CCK8	上海碧云天生物技术有限公司

1.1.3 主要试剂配制

(1) 10%完全培养基: 10%FBS+1%青链霉素抗生素+90% DMEM培养基。

(2) 3%病毒维持液: 3%FBS+0.1%胰酶（浓度为 2.5%）+1% 青链霉素抗生素+97%DMEM培养基。

(3) 转染培养基: Lipo8000 转染试剂于使用前混匀, 100ul DMEM培养基中加入 5ul Lipo8000。

(4) 1×电泳液: 称量 18.88g Glycine, 3.03g Tris, 1g SDS加入 ddH₂O定容到 1L, 加入磁力搅拌器搅拌均匀。

(5) 1×电转液: 称量 14.4g Glycine, 2.9g Tris, 100ml无水乙醇, 后加入 ddH₂O定容到 1L, 加入磁力搅拌器搅拌均匀。

(6) TBST: 取一包2×TBS粉末, 加入ddH₂O定容到2L, 加入磁力搅拌器搅拌均匀。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、传代与细胞冻存

16HBE和Vero-E6 细胞系来源于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC), 保存在重庆医科大学附属儿童医院感染与免疫重点实验室。

(1) 细胞复苏: 从-80℃超低温冰箱取出细胞, 在 37℃水浴锅中快速融化, 转移至 15ml离心管, 加入 2ml 10% FBS完全培养基 1000rpm离心 3min。离心后弃上清, 加入 1ml 10% FBS完全培养基进行重悬, 转移至培养皿中, 在 37℃、含 5% CO₂ 孵箱中培养。

(2) 细胞传代: 显微镜下观察细胞状态, 待细胞生长至 70-80% 时, PBS溶液洗三次, 用 0.25% 胰酶进行消化, 其中 16HBE消化 7min, Vero-E6 消化 3min, 消化完成后, 加入 2ml 10% FBS完全培养基终止消化, 1000rpm离心 3min后重悬, 按 1:3 的比例进行细胞传代。

(3) 细胞冻存: PBS缓冲液清洗细胞 3 次, 加入 0.25% 胰酶进行消化, 消化完成后加入 2ml 10% FBS完全培养基终止消化, 1000rpm离心 3min后加入无血清细胞冻存液, 吹打均匀后转入细胞冻存管中, 随后转入-80℃超低温冰箱保存。

1.2.2 病毒培养

课题组前期通过反向遗传技术重组构建hMPV, 病毒基因型为A型 (hMPV NL/1/00)。采用Vero-E6细胞进行病毒扩增, 待细胞铺满至 70-80%, PBS液清洗细胞 3 次, 每瓶加入 1ml hMPV病毒液摇晃均匀, 待病毒吸附 2h后, 更换 15ml

3%FBS病毒维持液进行病毒扩增。当GFP荧光量达到 80%时, 收集细胞和上清液, 于-80℃冰箱冷冻保存。样品经过反复冻融3次, 然后在4℃下 5000rpm离心 30min。然后用 0.22um过滤器过滤得到的上清液。

1.2.3 核酸提取

(1) 收集不同处理组的细胞裂解液。孔板细胞数 $\leq 2 \times 10^6$ cells, 加入 350 ul RTL Lysis Buffer; $> 2 \times 10^6$ cells, 加入 700ul RTL Lysis Buffer。小心吹打使细胞从壁上脱落下来, 转移至 1.5ml离心管。

(2) 加入等倍体积的RNA Binding Buffer至细胞裂解液中, 吹打 5-10 次。转移 ≤ 700 ul 混合液到HiPure RNA Mini Column柱子中, 12000xg离心 60 秒。

(3) 离心后倒弃滤液, 加入 350ul Buffer RW1 至柱子中, 12000xg 离心 1min。倒弃滤液, 加入 500ul Buffer RW2 在柱子中, 离心 1min, 重复此操作一次。

(4) 将柱子装入 1.5ml离心管中, 加入 50ul RNA Free Water至柱子膜中央。室温静置 2min, 12000xg 离心 1min。最后, 弃去柱子, 搜集RNA测浓度后逆转录。

(5) 合成cDNA: 根据ABclonal逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录成cDNA, 冻存于-20℃备用。

反转录条件为:

温度	时间
37℃	2min
55℃	15min
85℃	5min
4℃	30s

1.2.4 实时荧光定量PCR

(1) SYBR Green Dye染料法：采用SYBR Green Dye检测IL-1 β 基因的相对表达量，以GAPDH为内参。

反应体系为：

SYBR	5ul
F	0.5ul
R	0.5ul
H ₂ O	2ul
cDNA	2ul

反应设置程序为：95℃ 3 min, 95℃ 5 s, 63℃ 30 s, 40 个循环。

在实时荧光定量PCR仪中进行反应，使用CFX Manager软件对数据进行分析。

用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法分析靶基因表达的相对定量。具体引物序列见表 1。

表 1 引物序列及长度

基因	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	21
	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	23
IL-1 β	ATCAGCACCTCTCAAGCAG	19
	AGTCCACATTCAGCACAGG	19

1.2.5 蛋白质印迹

(1) 配制含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂 (PMSF) 的RIPA裂解缓冲液 (PMSF:RIPA=1:100)，PBS洗三次，每孔加入 200ul裂解液，用细胞刮裂解细胞，置于冰上裂解细胞 30 分钟,每隔 10min涡旋一次。

(2) 4℃，12000rpm离心 10min，吸取上清液，采用BCA法测定蛋白浓度。

按照说明书在 96 孔板加入标准品及样本，提前配好BCA工作液 (A液：B液

=1:50), 每孔加入 200ul工作液, 37℃ 孵育 30min, 采用酶标仪检测样本浓度。

(3) 将样品与 5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液按 1:4 的比例混合均匀。金属锅 100℃ 煮 10 分钟。冻存于-80℃ 超低温冰箱备用。

(4) 制胶: 根据说明书制备 10%浓度的胶。蛋白质样品上样量统一为 30-50ug, 蛋白maker上样为 5ul。

(5) 电泳: 采用SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质。先低电压 80V跑浓缩胶, 再 120V跑分离胶。

(6) 转膜: 预先裁剪合适的PVDF膜, 根据目标条带位置进行裁剪, 按照“黑胶白膜”的顺序组装成三明治夹, 设定电流为 230mA, 进行电转。设置转膜时间, 1kDa 1min。

(7) 封闭: 转膜结束后, 先用TBST溶液洗膜 5min, 而后将膜置于快速密封溶液中, 室温下封闭 15min。封闭结束后再次洗涤 5min。

(8) 一抗孵育: 将特异性一抗与膜在 4℃温度下孵育过夜, 抗体稀释比例为 1:1000。所用抗体如下:hMPV、IL-1β 和GAPDH。

(9) 二抗孵育: 用TBST洗涤三次, 每次 10min, 用HRP标记的绵羊抗兔或山羊抗小鼠IgG在室温下孵育 1h。随后, 用TBST快速洗涤三次, 每次 10min。

(10) 曝光: 使用ECL发光液进行曝光和显影, 并使用Image J软件分析所得灰度值。

1.2.6 免疫荧光

(1) 细胞用PBS洗涤一次, 4%多聚甲醛在室温下固定 15min。

- (2) PBS冲洗三次，随后用荧光封闭液在室温下孵育 1h。
- (3) 一抗孵育：配制hMPV N蛋白一抗稀释液（稀释比例为 1:500），每孔加入 250ul一抗，在 4℃下孵育过夜。
- (4) 二抗孵育：PBS洗涤三次后，用山羊抗小鼠IgG H&L Alexa Fluor 488 (稀释比例为 1:2 000) 处理，37℃孵育 1h。注意接下来的步骤都要避光处理。
- (5) DAPI孵育：PBS洗涤三次，室温下用DAPI孵育 1h（稀释比例为 1:5 000），进行细胞核染色。
- (6) 封片：PBS洗涤三次，然后加入 10ul含 4,6 -二氨基-2-苯乙烯醇的抗荧光猝灭密封溶液，在防滑片上制备细胞载玻片。
- (7) 荧光拍照：制片结束后，将玻片放入湿盒中（避光保存，防止滑片），在激光共聚焦显微镜下观察荧光并拍照保存。

1.2.7 小干扰RNA

使用IL-1 β 小干扰RNA及其阴性对照（siRNA-NC）进行后续实验。转染实验前，提前一天将 2×10^5 细胞接种到 24 孔板中，将 8×10^5 细胞接种到 6 孔板中。当孔板细胞培养密度达到 70-80%时进行转染效果最好。根据试剂制造商的说明，将 1.6ul Lipo8000 和 40pmol si-IL-1 β 转染到 24 孔板中 24 小时，检测IL-1 β mRNA水平。同时，将 5ul Lipo 8000 和 100pmol si-IL-1 β 转染到 6 孔板中。转染 48h后检测IL-1 β 蛋白水平。NC与实验组作为空白对照进行比较。具体引物序列见表 2。

表 2 引物序列及长度

基因	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
NC (阴性对照)	GGCUCUAGAAAAGCCUAUGC	20
	CCGAGAUCUUUUCGGAUACG	20
1#siRNA	CCUUCAUCUUUGAAGAAGA	19
	UCUUCUCAAAGAUGAAGG	19
2#siRNA	GAGAAGAAAGUAAUGACAA	19
	UUGUCAUUACUUUCUUCUC	19
3#siRNA	CAAUAACAAGCUGGAAUUU	19
	AAAUUCCAGCUUGUUAUUG	19

1.2.8 外源性补充重组人IL-1 β

预先接种 8×10^5 cells到 6 孔板中。当细胞达到 70-80%密度时, 用 30ng/ml rhIL-1 β 处理 24h后感染hMPV (MOI=10), 2h后更换 3%的病毒维持液继续培养 48h。收集细胞裂解液, 测定蛋白表达水平。

1.2.9 ELISA检测

(1) 收集 16HBE细胞感染hMPV不同时间点的 6 孔板细胞培养上清, 检测细胞因子IL-1 β 的表达。

(2) 从室温平衡 10min后的铝箔袋中取出所需板条, 剩余放回 4℃冰箱。

(3) 加样: 分别将样品或不同浓度标准品按 100ul每孔加相应孔中, 空白孔中加入 100ul通用稀释液。盖上板膜 37℃孵育 1h。

(4) 加生物素化抗体: 取出酶标板, 弃去液体, 直接计入生物素化抗体 100ul, 盖上板膜后温育 1h。

(5) 洗板: 弃去液体, 每孔加 300ul 1×洗涤液重复洗涤三次, 用力拍干。

- (6) 加酶结合工作液：每孔加入酶结合工作液 100ul，盖板上膜后 37℃ 温育 30min。
- (7) 洗板：同操作 (5)。
- (8) 加底物：每孔加入底物 (TMB) 90ul，盖上封板膜，37℃ 避光温育 15min。
- (9) 加终止液：每孔加入 50ul 终止液，立即在 450nm 波长处测定各孔 OD 值。
- (10) 最后绘制标准曲线计算结果。

1.2.10 统计分析

实验数据采用 GraphPad prism 8.0 进行统计分析。两组均数比较采用组间 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析。进一步两两比较采用 LSD-t 检验。以 $P < 0.05^*$ 、 $P < 0.001^{**}$ 、 $0.05 < P < 0.001^{***}$ 为判定标准，判断是否有统计学意义。这些统计检验用于确定组间是否存在显著差异。

2 结果

2.1 hMPV 感染 16HBE 细胞模型构建

首先我们检测了hMPV在 16HBE细胞中复制的能力，以评估其是否可以作为hMPV感染的模型。细胞被 10MOI的hMPV感染并培养 24、48、72h，对感染和未感染hMPV的细胞进行免疫荧光分析，如图 1A-B所示，结果显示hMPV N蛋白的表达随着感染时间增加而上升。通过Western Blot在每个时间点检测细胞的病毒载量，定量分析结果显示hMPV N蛋白表达随时间增加，如图 1C-D所示。以上结果表明hMPV能成功感染 16HBE细胞。

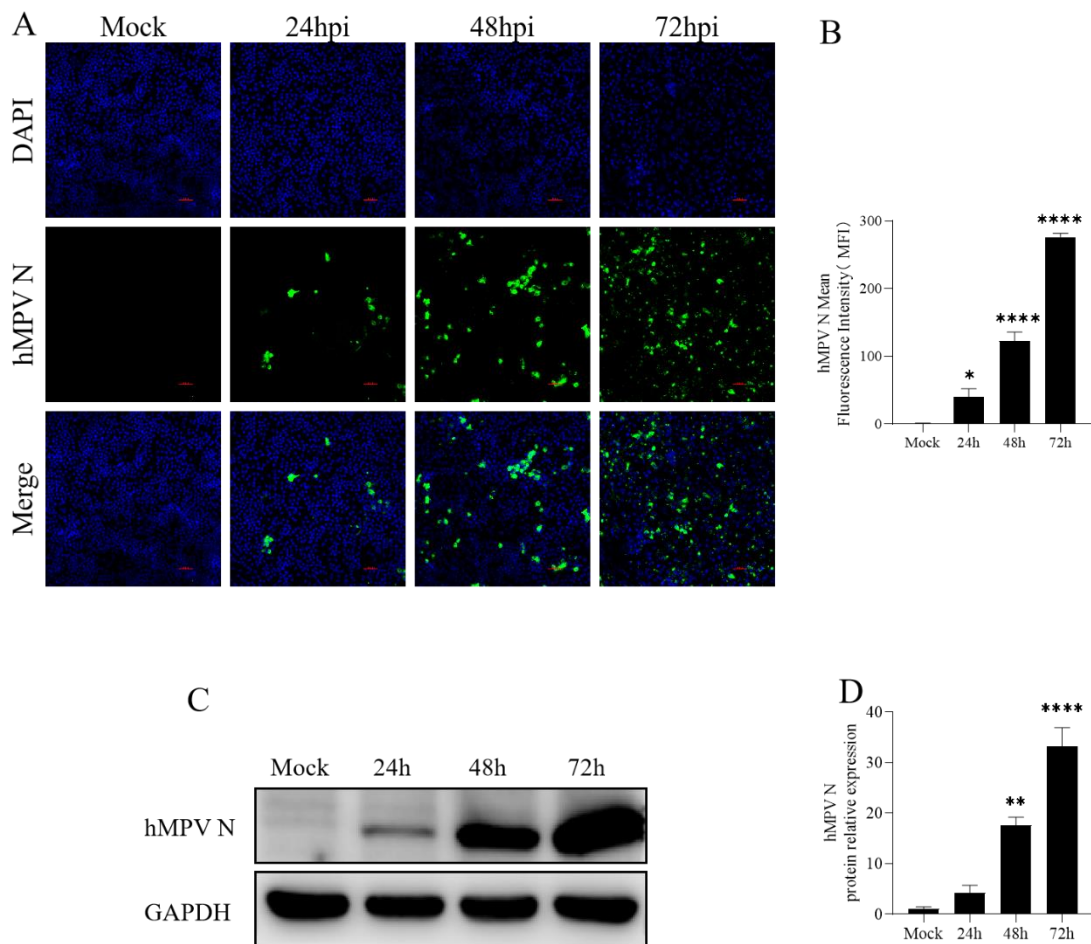


图 1 hMPV成功感染 16HBE细胞

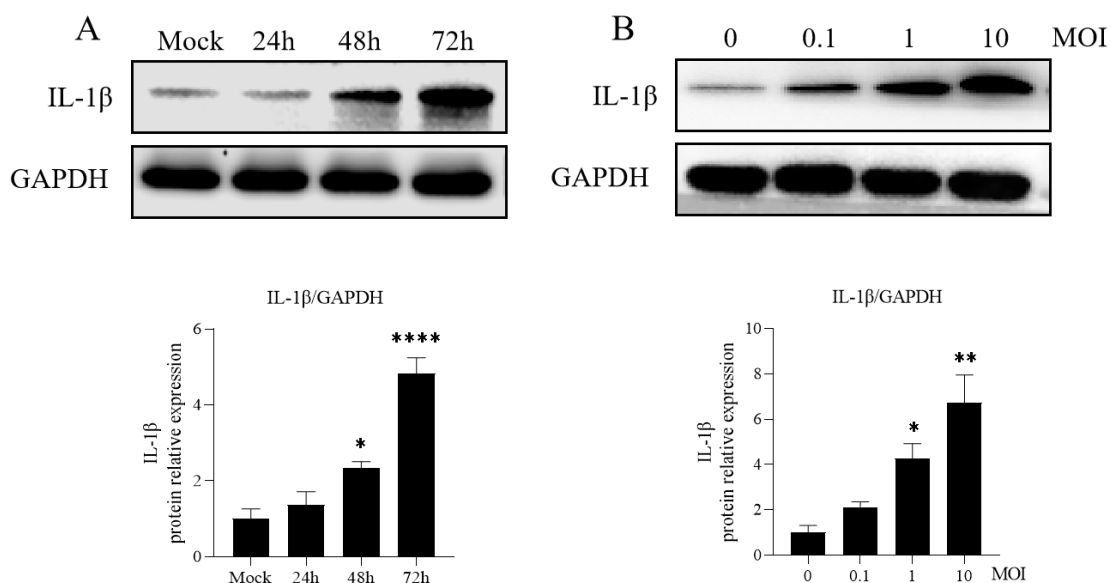
(A-B) 免疫荧光检测hMPV N蛋白的表达及平均荧光强度分析 (C-D) WB检测hMPV感染不同时间点N蛋白的表达及其相对表达柱状分析图

Figure 1 hMPV successfully infects 16HBE cells

(A-B) The expression and average fluorescence intensity of hMPV N protein were detected by IF (C-D) The expression of N protein and its relative expression at different time points of hMPV infection were detected by WB

2.2 hMPV感染 16HBE细胞后IL-1 β 的表达

我们检测了hMPV感染 16HBE细胞 24、48、72h后IL-1 β 的表达变化。10MOI hMPV感染 16HBE细胞后，在不同时间点收集细胞及其上清。如图 2A、2C所示，hMPV感染后，IL-1 β 蛋白表达以时间依赖性方式明显增加且差异具有统计学意义。然后我们分别用 0.1，1，10MOI的hMPV感染 16HBE细胞 72h后收集细胞。如图 2B所示，IL-1 β 蛋白表达与病毒滴度呈剂量依赖性增加且差异具有统计学意义。以上数据表明，hMPV感染促进了 16HBE细胞中IL-1 β 的表达。



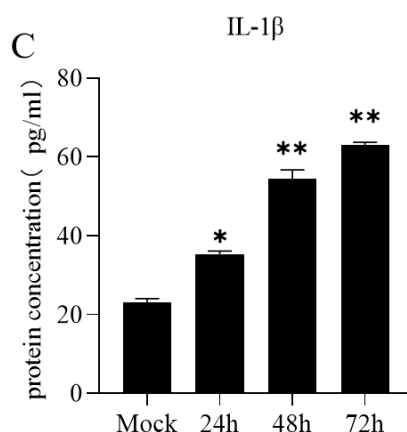


图 2 hMPV感染 16HBE细胞后IL-1 β 表达升高

(A) 16HBE细胞感染hMPV后 0、24、48、72h IL-1 β 的表达及其相对表达柱状分析图 (B) 不同MOI的hMPV感染 16HBE细胞 72h后IL-1 β 的表达及其相对表达柱状分析图 (C) ELISA法检测hMPV感染 0、24、48、72h后细胞培养上清分泌IL-1 β 的蛋白浓度

Figure 2 IL-1 β expression was increased after hMPV infection with 16HBE cells

(A) Expression of IL-1 β in 16HBE cells at 0, 24, 48, 72 hours after infection with hMPV and its histogram analysis of relative expression (B) Expression of IL-1 β in 16HBE cells after 72h infection with hMPV with different MOI and its histogram analysis of relative expression (C) ELISA was used to detect the concentration of IL-1 β secreted by cell culture supernatant after 0, 24, 48 and 72h of hMPV infection

2.3 小干扰RNA (siRNA)敲除 16HBE细胞中的IL-1 β

为了进一步研究IL-1 β 对hMPV感染的作用，我们采用小干扰RNAs靶向敲低IL-1 β 的表达。如图 3A-B所示，通过qRT-PCR检测以及Western Blot检测IL-1 β 的敲低效率，结果显示 3# siRNA序列效果最佳，后续实验均选择该序列。

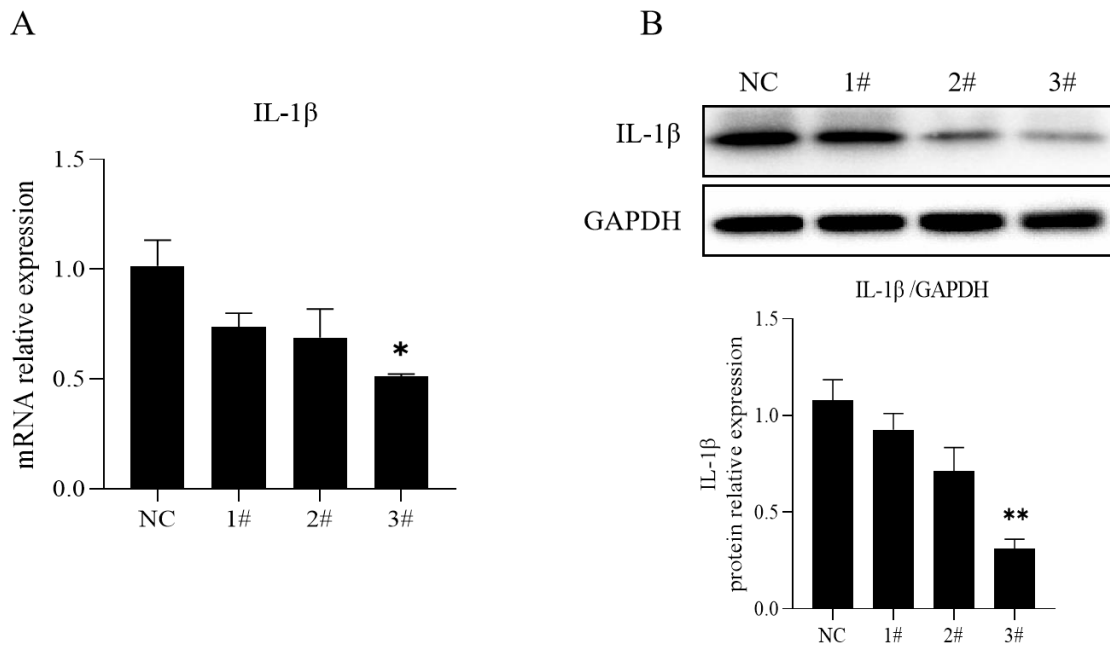


图 3 选择IL-1β沉默的最佳序列

(A) qRT-PCR检测siRNAs转染到 16HBE细胞中 24h后IL-1β mRNA表达水平 (B) WB检测siRNAs转染到 16HBE细胞中 48h后IL-1β蛋白表达水平及其相对表达柱状分析图

Figure 3 Selecting the optimal sequence for IL-1β knockdown

(A) The expression level of IL-1β mRNA was detected by qRT-PCR after transfection of siRNAs into 16HBE cells for 24h (B) The expression of IL-1β protein was detected by WB after transfection of siRNAs into 16HBE cells for 48h and its histogram analysis of relative expression

2.4 小干扰RNA作用下IL-1β的检测

为了确保IL-1β的表达在整个hMPV感染过程中被抑制，我们分别通过ELISA检测了细胞上清IL-1β的分泌，如图 4A所示，采用qRT-PCR检测IL-1β mRNA表达水平，如图 4B所示，Western Blot检测IL-1β成熟蛋白表达水平，如图 4C所示。以

下结果证实，在hMPV感染时，IL-1 β 的表达受到抑制。

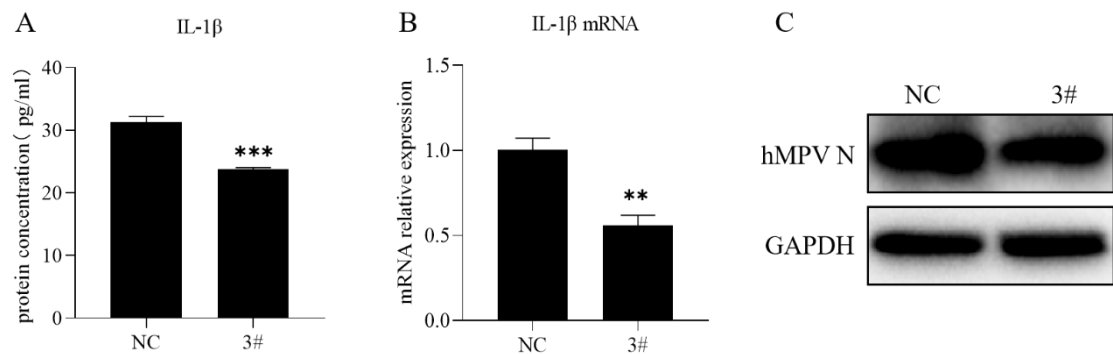


图 4 3# siRNA处理 16HBE细胞后IL-1 β 的表达水平

(A) ELISA检测 3#siRNA处理后细胞上清液中成熟IL-1 β 表达水平 (B) qRT-PCR检测 3# siRNA处理下pro-IL-1 β 的mRNA水平 (C) WB检测 3#siRNA处理后IL-1 β 蛋白的表达

Figure 4 Expression levels of IL-1 β in 16HBE cells treated with 3# siRNA

(A) The expression level of mature IL-1 β in cell supernatant treated with 3#siRNA was detected by ELISA (B) The mRNA level of pro-IL-1 β was detected by qRT-PCR after 3# siRNA treatment (C) The expression of IL-1 β protein after 3#siRNA treatment was detected by WB

2.5 小干扰RNA对hMPV复制的影响

我们通过靶向IL-1 β 的siRNA转染 16HBE细胞，再感染 10MOI hMPV48h，进而研究IL-1 β 对hMPV复制的影响。通过免疫荧光和Western Blot检测IL-1 β 敲低后hMPV N蛋白的表达情况。如图 5A-D所示，在 3# siRNA处理下，hMPV N蛋白荧光表达及病毒载量均表达下调，差异有统计学意义。以上结果证明IL-1 β 的敲低能抑制hMPV复制。

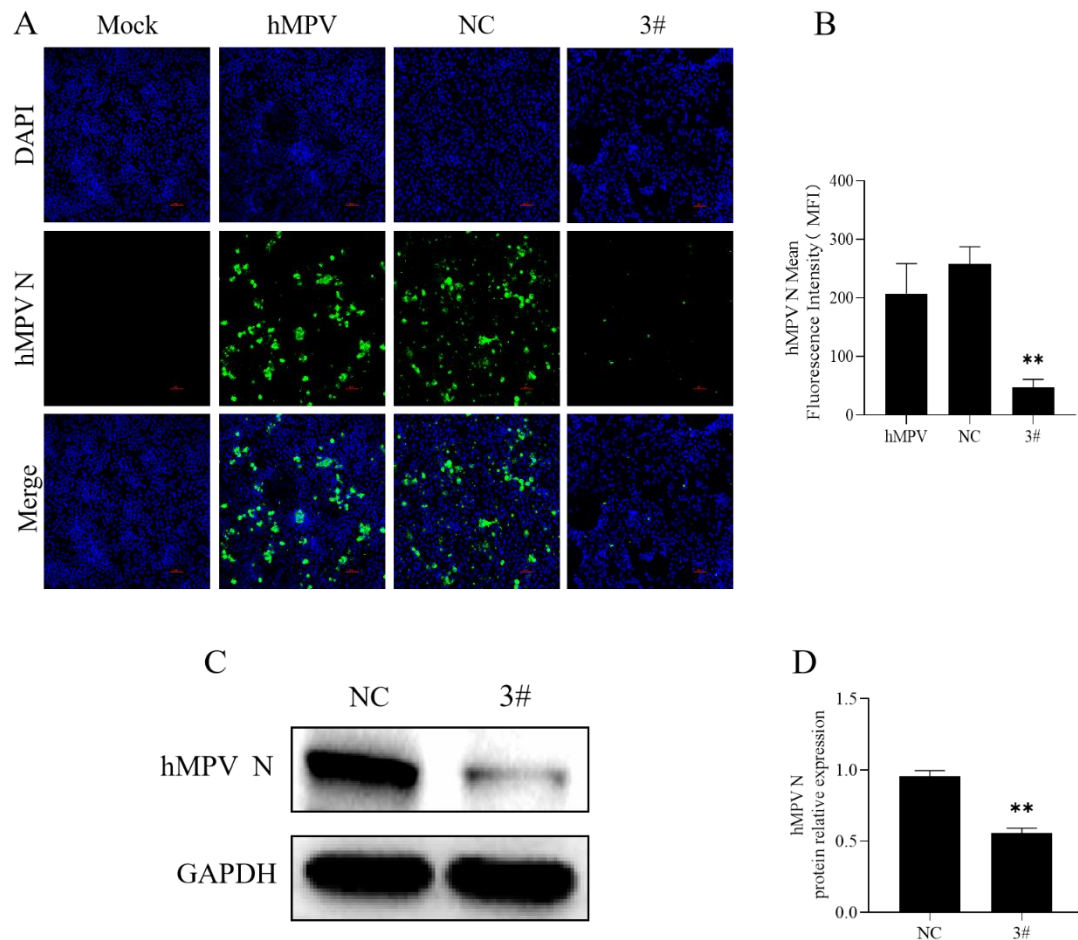


图 5 IL-1 β 的敲低能抑制hMPV复制

(A-B) 免疫荧光检测 3# siRNA处理下hMPV N蛋白表达水平及其平均荧光强度统计分析图 (C-D) WB检测靶向IL-1 β 的 3# siRNA处理下hMPV N蛋白的表达及其相对表达柱状图

Figure 5 IL-1 β knockdown inhibits hMPV replication

(A-D) The expression level of hMPV N protein was detected by IF and its average fluorescence intensity after treatment with 3# siRNA (C-D) WB detected the expression of hMPV N protein and its relative expression histogram after treatment with 3# siRNA

2.6 外源性添加rhIL-1 β 对hMPV复制的影响

我们外源性添加 30ng/ml rhIL-1 β 刺激 16HBE细胞 24h，然后再感染 10MOI hMPV 48h。通过免疫荧光和Western Blot检测hMPV N蛋白的表达，如图 6A-D所示。结果表明，与单独感染hMPV细胞组相比，rhIL-1 β 刺激细胞组中hMPV复制增加。我们重复了在 3# siRNA处理下外源性添加rhIL-1 β 蛋白的实验，如图 6E-F所示。3#siRNA沉默IL-1 β 后，hMPV N蛋白表达降低，外源性添加rhIL-1 β 刺激后，hMPV N蛋白表达升高。以上研究证明了IL-1 β 可以促进hMPV在 16HBE细胞中的复制

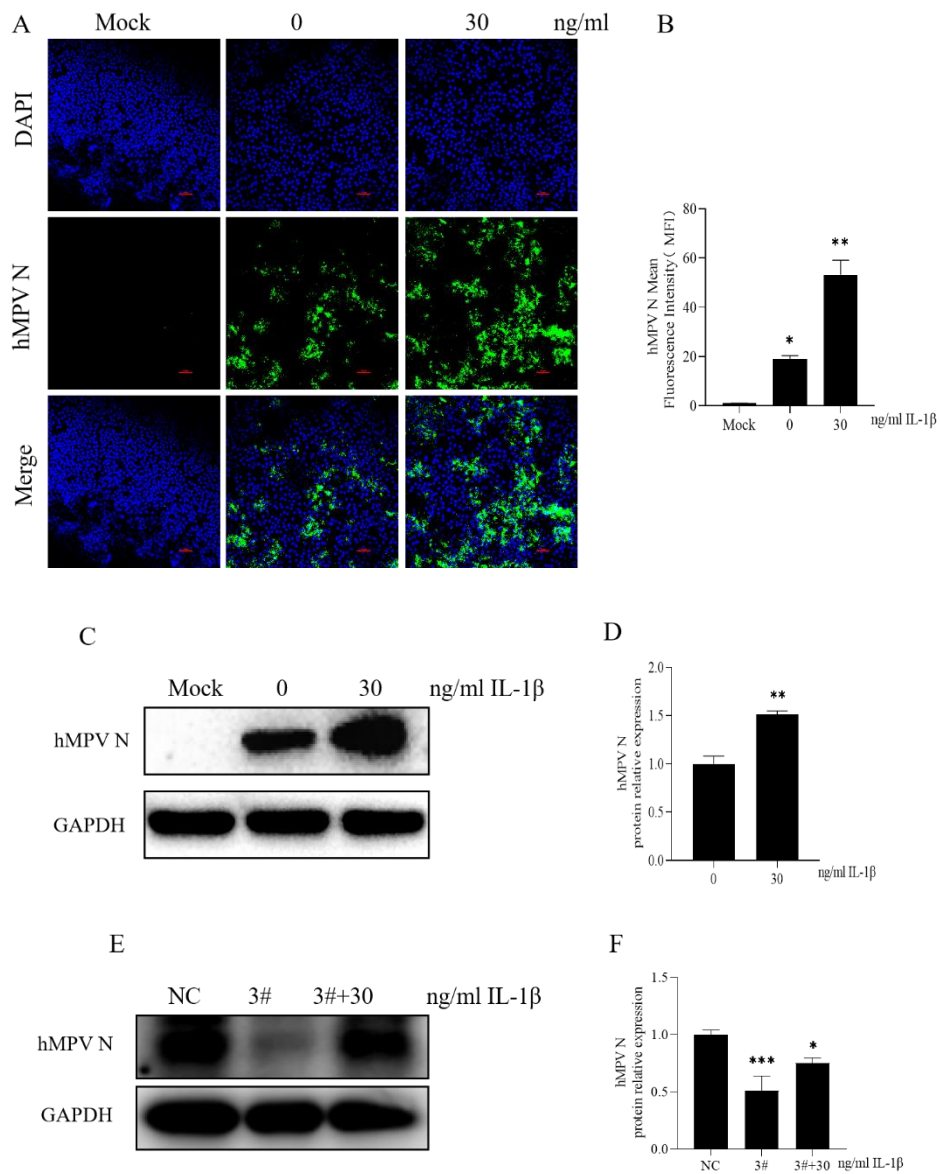


图 6 外源性添加rhIL-1 β 促进hMPV复制

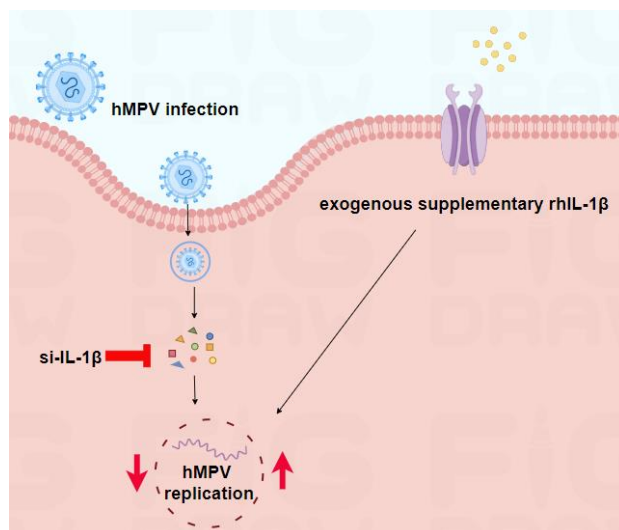
(A-B) 免疫荧光检测 30ng/ml IL-1 β 蛋白处理后hMPV N蛋白表达水平及其平均荧光强度统计分析图 (C-D) WB检测靶向rhIL-1 β 处理后hMPV N蛋白的表达及其相对表达柱状图 (E-F) WB检测 3# siRNA处理下外源性补充 30ng/ml rhIL-1 β 后的hMPV N蛋白的表达及其相对表达柱状图

Figure 6 IL-1 β promotes hMPV replication in 16HBE cells

(A-B) The expression level of hMPV N protein was detected by IF and its average fluorescence intensity after treatment with 30ng/ml IL-1 β protein (C-D) WB detected the expression of hMPV N protein and its relative expression histogram after treatment with rhIL-1 β (E-F) WB detected the expression of hMPV N protein and its relative expression histogram after exogenous supplement of 30ng/ml rhIL-1 β under 3# siRNA treatment

2.7 IL-1 β 促进hMPV感染的示意图

根据第一部分的研究结果绘制IL-1 β 在hMPV感染中作用的示意图，如图 7 所示，hMPV感染后诱导IL-1 β 分泌，IL-1 β 反过来促进了hMPV感染。

图 7 IL-1 β 促进hMPV感染Figure 7 IL-1 β promote hMPV infection

3 讨论

hMPV是一种单负链RNA病毒，在全球范围内广泛传播。鉴于RNA病毒特有的快速进化能力，hMPV持续构成潜在的流行病威胁^[19]。在免疫应答中，IL-1 β 作为关键的细胞因子，不仅参与细胞间通讯，还在病毒感染过程中发挥至关重要的作用。研究表明IL-1 β 的水平与hMPV感染的严重程度密切相关^[20, 21]。临床数据显示，在严重hMPV感染病例中，IL-1 β 的水平显著升高，这种升高程度相比呼吸道合胞病毒（RSV）患者更为明显^[22, 23]。因此，目前尚不清楚IL-1 β 在病毒感染期间对宿主是有益还是有害。

病毒复制的调控对疾病的进展至关重要，IL-1 β 在不同病毒感染中扮演不同的角色。IL-1 β 主要由单核细胞和巨噬细胞产生，是宿主抵抗病毒感染的一种常见免疫反应^[24, 25]。尽管IL-1 β 在病毒复制中的作用机制复杂且多样，但其在某些病毒复制过程中的重要性已得到验证。例如，研究表明细胞因子IL-1 β 在感染时的释放会启动炎症性正反馈回路，从而促进逆转录病毒复制、免疫激活和发病机制^[26]。此外，IL-1 β 可以增加小鼠免疫细胞对人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus, HIV）感染的敏感性，并促进病毒在CD4⁺T淋巴细胞和单核细胞/巨噬细胞中的复制^[27]。然而，值得注意的是，研究发现用外源性IL-1 β 治疗可减少分化的HepaRG（dHepaRG）或原代人肝细胞（PHH）细胞内HBV及HDV复制，首次证明了极低剂量的IL-1 β 对乙型肝炎病毒（HBV）和丁型肝炎病毒（HDV）诱导的强烈而快速的抗病毒作用^[28]。缺乏IL-1 β 受体的动物对西尼罗病毒（WNV）的易感性增加^[13]，这表明IL-1 β 的作用具有病毒特异性。外源性添加IL-1 β 可以激活

cGAS-STING信号通路诱导强大的先天免疫应答，从而抑制登革热病毒的复制^[31]。

在动物中敲低IL-1 β 显示出Sindbis病毒感染的发病机制和致死率增加^[33]。然而，IL-1 β 在hMPV感染中发挥的作用尚不清楚。

在本研究中，我们首先成功建立了 hMPV 感染细胞模型。hMPV 感染细胞后，我们发现 IL-1 β 的表达呈现出时间依赖性和剂量依赖性增加。当细胞转染靶向 IL-1 β 基因的 siRNA 后，hMPV 的复制减少，外源补充 rhIL-1 β 后，hMPV 的复制增加。同时我们还在 IL-1 β 沉默的基础上补加了 rhIL-1 蛋白进行 hMPV 感染回复验证，进一步证实了 IL-1 β 与 hMPV 复制的相互作用关系。研究表明 IL-1 β 表达与 hMPV 复制呈正相关，即 IL-1 β 能促进 hMPV 复制，然而其作用的具体机制有待进一步研究。

4 小结

本研究通过小干扰RNA及外源性添加rhIL-1 β 调节IL-1 β 的表达从而揭示了IL-1 β 与hMPV之间的相互作用关系，IL-1 β 能促进hMPV的复制，但其发挥作用的具体机制尚不清楚。

第二部分 IL-1 β 通过cGAS-STING调控人偏肺病毒感染的机制研究

在全球范围内，呼吸道病毒占急性下呼吸道感染（包括肺炎和细支气管炎）所有病因的一半，超过一半的呼吸道疾病住院患儿检测到呼吸道病毒^[29]。在众多呼吸道病毒中，hMPV 是仅次于 RSV 的第二大儿童易感呼吸道病毒。血清阳性率研究表明，hMPV 在全球范围内广泛分布，并且儿童在生命早期就有可能接触到这一病毒，到 5 岁时，大约 70% 的儿童产生 hMPV 抗体^[30]。该病毒已在人群中传播至少 70 年。然而，我们对它的了解却仍然有限。我们迫切需要加强对 hMPV 的研究，为未来的预防和治疗提供更有力的支持。

在第一部分的细胞实验中，我们已经证实了 IL-1 β 能促进 hMPV 感染的作用，然而其具体发挥作用的机制仍不清晰。研究表明，在病原体感染期间，IL-1 β 能够导致线粒体损伤以产生活性氧（ROS），然后被 cGAS 和 STING 途径识别以诱导干扰素（IFN）并指导限制病原体感染的强效先天免疫反应^[31]。cGAS-STING 信号通路在多种病毒感染中扮演着重要的角色，而 IL-1 β 作为重要的炎症介质，与 cGAS-STING 信号通路之间的关联逐渐受到关注。

cGAS 是一种先天 DNA 传感器，在各种生理和病理过程中起着关键作用，例如细胞衰老、自噬、针对微生物感染的先天免疫反应、肿瘤免疫和其他炎症性疾病^[32]。在细胞质中感应 DNA 或 RNA：DNA 杂交体后，cGAS 催化其底物 GTP 和 ATP，以产生环磷酸鸟苷一磷酸腺苷（cGAMP），这是结合并激活内质网（ER）

相关的 STING 的第二信使^[33]。研究表明 IL-1 β 可能以时间和剂量依赖性方式触发 DNA 损伤和 STING 表达的增加^[31]。越来越多的 RNA 病毒感染过程中也观察到了 cGAS-STING 信号通路的激活^[7]。最近的研究主要集中在 cGAS-STING 信号通路在抗病毒和抗菌免疫反应中的作用。因此我们将研究在 hMPV 感染中, IL-1 β 能否通过调控 cGAS-STING 通路发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与设备

同第一部分

1.1.2 主要试剂

试剂名称	生产公司
cGAS抗体	杭州华安生物技术有限公司
STING抗体	杭州华安生物技术有限公司
Phospho-STING抗体	美国Abmart
RU.521	Selleck
G150	Selleck
H-151	Selleck

其他试剂同第一部分

1.1.3 主要试剂配制

同第一部分

1.2 方法

同第一部分

1.2.1 细胞培养、传代与细胞冻存

同第一部分

1.2.2 病毒培养

同第一部分

1.2.3 核酸提取

同第一部分

1.2.4 实时荧光定量PCR

(1) SYBR Green Dye染料法：采用SYBR Green Dye检测cGAS、STING、I型干扰素（IFN-Is，如IFN- α 、IFN- β ）基因的相对表达量，以GAPDH为内参。在3#或IL-1 β 蛋白处理下提取hMPV复制过程中的细胞质线粒体DNA（mtDNA）和总DNA。采用qRT-PCR定量检测含特定线粒体（MT-ATP6）和核（RPL13A）基因的DNA水平，以RPL13A为内参。

反应体系及反应设置程序同第一部分。

在实时荧光定量PCR仪中进行反应，使用CFX Manager软件对数据进行分析。用 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法分析靶基因表达的相对定量。

(2) TaqMan探针法用于病毒滴度测定。探针序列为5'-TTGCCAACACACGAACTCCATTCCC-3'；

反应体系为：

Taq qPCR Pemix	5ul
F	0.5ul
R	0.5ul
P	0.5ul
H ₂ O	1.5ul
cDNA	2ul

反应程序设置为：95℃ 30 s、95℃ 5 s、65℃ 30 s、40 个循环。

具体引物序列见表 3。

表 3 引物序列及长度

基因	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
hMPV	GAGCAATAGCACTCGGTGTTG	21
	TCACAAAATCTTTCAGCTCTCTCAC	25
cGAS	TAACCCTGGCTTTGGAATC	19
	TGGGTACAAGGTAAAATGGCTTT	23
STING	CCAGAGCACACTCTCCGGTA	20
	CGCATTTGGGAGGGAGTAGTA	21
RPL13A	GCCCTACGACAAGAAAAAGCG	21
	TACTTCCAGCCAACCTCGTGA	21
MT-ATP6	AATCCAAGCCTACGTTTTTACA	22
	AGTATGAGGAGCGTTATGGAGT	22
IFN- α	GCCTCGCCCTTTGCTTTACT	20
	CTGTGGGTCTCAGGGAGATCA	21
IFN- β	GCTTCTCCACTACAGCTCTTTC	22
	CAGTATTCAAGCCTCCCATTCA	22

1.2.5 蛋白质印迹

同第一部分

1.2.6 免疫荧光

同第一部分

1.2.7 外源性补充重组人IL-1 β

同第一部分

1.2.8 抑制剂处理

提前接种 8×10^6 cells于 6 孔板中,当细胞密度达到 70-80%时,用不同浓度的 RU.521、G150 或H-151 和二甲基亚砜(DMSO)处理细胞 24h。细胞感染 10MOI hMPV 2h后,更换 3%FBS病毒维持液,在培养箱中继续培养 48h。最后,收集细胞裂解液检测hMPV N蛋白。

1.2.9 统计分析

同第一部分

2 结果

2.1 cGAS-STING通路参与hMPV感染

研究报道IL-1 β 可以激活cGAS-STING信号通路在病毒感染中发挥重要作用。然而该通路是否参与hMPV感染期间IL-1 β 的诱导尚不清楚。在 0、24、48 和 72h用 10MOI hMPV 感染 16HBE细胞,通过qRT-PCR检测cGAS、STING mRNA水平,如图 1A-B,通过Western Blot检测cGAS、STING通路蛋白表达,如图 2C-E所示。结果显示感染hMPV后, cGAS和STING的mRNA和蛋白水平均上调。值得注意的是,经Western Blot证实, STING及其磷酸化表达均在 48h显著增高,因此后续实验我们选取 48h进行实验。

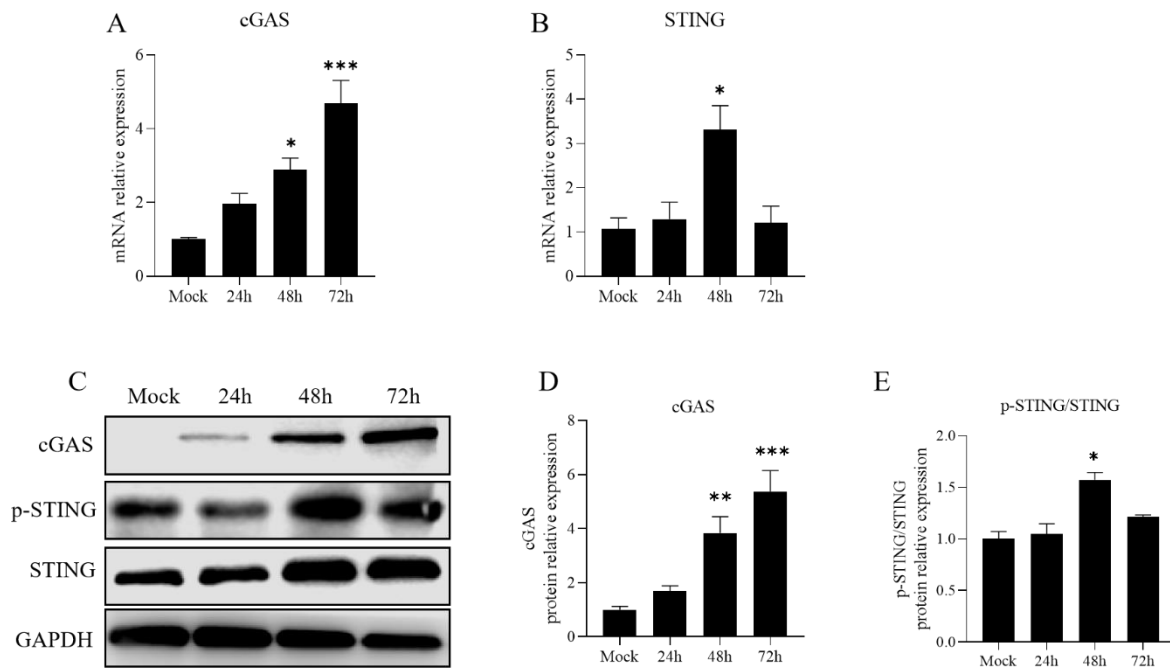


图 1 hMPV 感染激活cGAS-STING通路

(A-B) qRT-PCR检测cGAS和STING mRNA表达水平 (C-E) WB检测感染hMPV

不同时间点cGAS和p-STING/STING蛋白表达水平及其相对表达柱状分析图

Figure 1 cGAS-STING pathway activated by hMPV infection

(A-B) The mRNA levels of cGAS and STING were detected by qRT-PCR (C-E) The expression levels of cGAS and p-STING/STING proteins and their relative expression histogram at different time points of infected hMPV were detected by WB

2.2 IL-1 β 对cGAS-STING通路的影响

将NC和 3# siRNA转染到 16HBE细胞中，然后用 10MOI hMPV感染 48h，通过Western Blot检测cGAS和p-STING/STING蛋白水平并进行统计分析。沉默IL-1 β 后cGAS和p-STING/STING蛋白表达降低，如图 2A-C。用外源性添加rhIL-1 β 刺激细胞 24h，然后感染hMPV 48h后评估cGAS和p-STING/STING蛋白水平的变化并进

行统计分析，如图 2D-F所示。外源添加 30ng/ml rhIL-1 β 后cGAS和p-STING/STING蛋白的表达增加。以上结果表明，在hMPV感染过程中，IL-1 β 可调节cGAS-STING信号通路相关蛋白的表达。

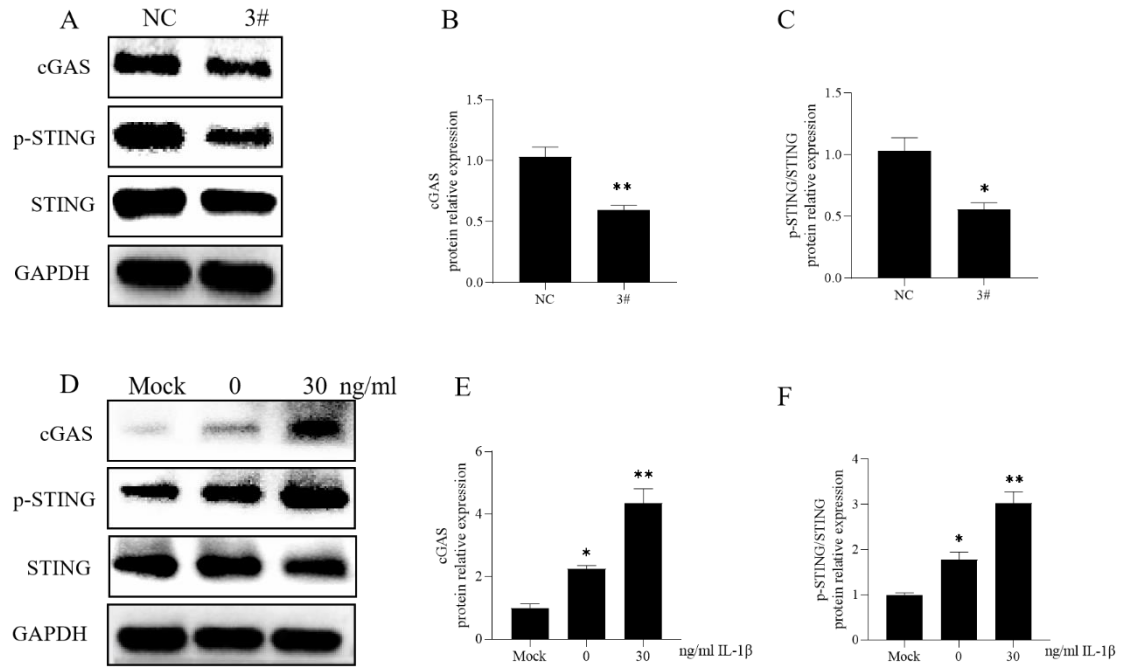


图 2 IL-1 β 可调节cGAS-STING通路

(A-C) WB检测siRNA处理下 16HBE细胞中cGAS或p-STING/STING蛋白的表达及其相对表达柱状统计分析图 (D-F) WB检测rhIL-1 β 处理下的 16HBE细胞中cGAS或p-STING/STING蛋白的表达及其相对表达柱状统计分析图

Figure 2 IL-1 β activation of cGAS-STING pathway affects hMPV replication

(A-C) The expression of cGAS or p-STING/STING protein and its relative expression in 16HBE cells treated with siRNA were detected by WB (D-F) The expression of cGAS or p-STING/STING protein and its relative expression in 16HBE cells treated with rhIL-1 β were detected by WB

2.3 细胞质mtDNA检测

研究表明,胞质mtDNA在诱导cGAS-STING通路激活中的作用必不可少。因此,在3# siRNA或rhIL-1 β 处理下,我们检测了hMPV复制过程中的胞质mtDNA的表达。细胞质和细胞核部分通过qRT-PCR量化含有特定线粒体(MT-ATP6)和核(RPL13A)基因的DNA水平,如图3A-B。结果发现,在3# siRNA存在下,MT-ATP6的表达下调。然而,与病毒处理的细胞相比,rhIL-1 β 刺激组细胞在细胞质部分出现显著的mtDNA富集。我们证实了IL-1 β 可通过mtDNA激活cGAS-STING通路从而在hMPV感染中发挥作用。

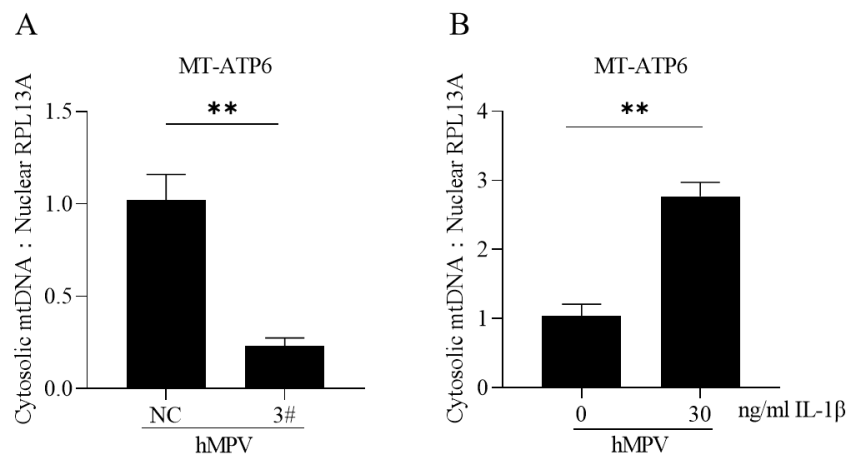


图3 IL-1 β 诱导mtDNA释放

(A-B) 采用qRT-PCR检测含特异性线粒体 (MT-ATP6) 的DNA水平,胞质mtDNA基因归一化为各自的核RPL13A

Figure 3 IL-1 β induces mtDNA release

(A-B) DNA levels containing specific mitochondria (MT-ATP6) were detected by qRT-PCR, and cytoplasmic mtDNA genes were normalized to their respective nuclear RPL13A

2.4 抑制剂的种类和浓度的探索

为了进一步研究cGAS-STING通路在hMPV复制中的作用,我们选取了不同类型的抑制剂如cGAS抑制剂RU.521、G150 及STING抑制剂H-151 进行实验。当细胞密度达到 70-80%时,用不同浓度的抑制剂和DMSO预处理细胞 24h,然后感染10MOI hMPV继续培养 48h。用Western Blot检测hMPV N蛋白的表达情况,如图4A-C所示,RU.521 较其他两种抑制剂效果最佳,其最佳抑制浓度是 10uM。因此,我们选取RU.521 进一步实验

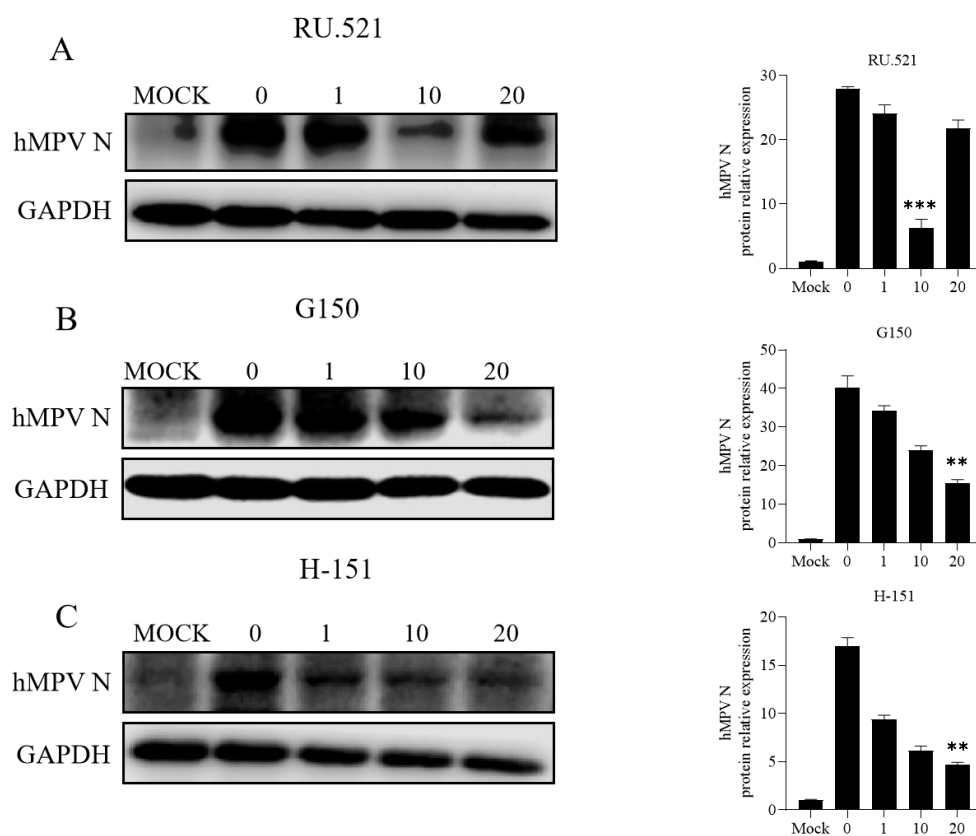


图 4 不同抑制剂处理下hMPV N蛋白的表达

(A-C) WB检测RU.521、G150、H-151 三种抑制剂处理后hMPV N蛋白的表达情况及其相对柱状统计分析图

Figure 4 Expression of hMPV N protein under different inhibitor treatments

(A-C) The expression of hMPV N protein was detected by WB after treatment with

three inhibitors RU.521, G150, H-151, and their relative expression histogram

2.5 cGAS抑制剂RU.521 对hMPV病毒复制的影响

我们通过免疫荧光和Western Blot检测了 10uM RU.521 处理细胞组中hMPV N蛋白的表达, 结果显示RU.521 可抑制hMPV的复制, 如图 5A-D所示。以上结果证明阻断cGAS-STING通路可使hMPV复制减少。

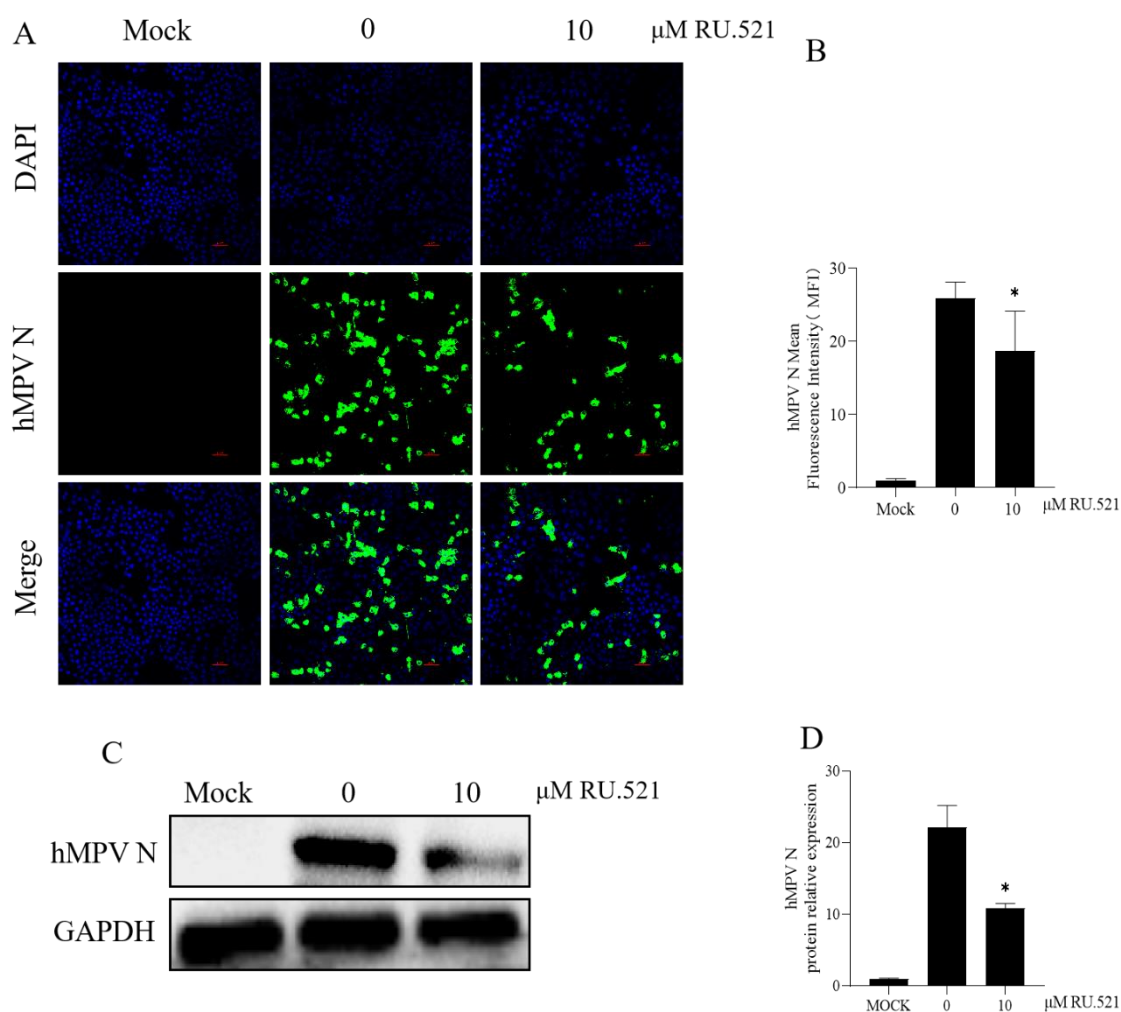


图 5 RU.521 抑制hMPV复制

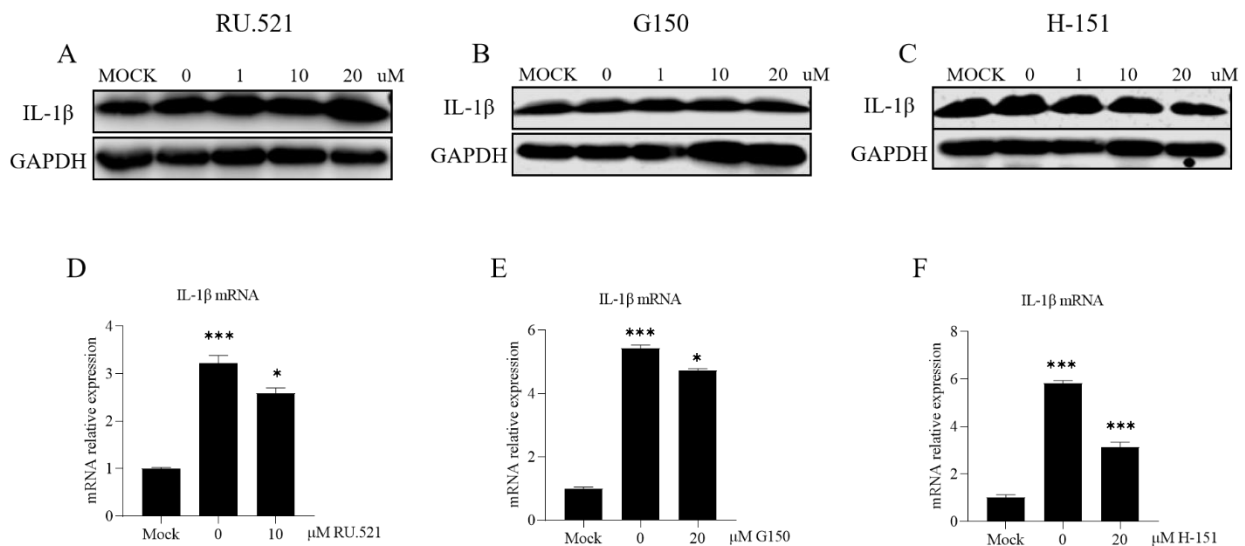
(A-B) 免疫荧光检测hMPV N蛋白表达水平及其平均荧光强度相对表达柱状分析图 (C-D) WB检测RU.521 处理后hMPV N蛋白的表达及其相对表达柱状分析图

Figure 5 RU.521 inhibits hMPV replication

(A-B) The expression level of hMPV N protein and its average fluorescence intensity were detected by IF (C-D) The expression of hMPV N protein and its relative expression after treatment with RU.521 were detected by WB

2.6 不同抑制剂处理IL-1 β 的表达

我们还检测了不同抑制剂处理下IL-1 β 的表达情况，结果如图 6A-F所示。使用通路抑制剂抑制cGAS或STING表达，通过Western Blot和qRT-PCR检测IL-1 β 的表达。结果表明，cGAS-STING通路抑制剂也抑制了IL-1 β 的表达。

图 6 cGAS-STING通路抑制剂可减少IL-1 β 的表达

(A-C) WB检测不同抑制剂作用下IL-1 β 的表达 (D-F) qRT-PCR检测在最佳抑制剂浓度下pro-IL-1 β 的mRNA水平

Figure 6 Inhibitors of cGAS-STING pathway can reduce the expression of IL-1 β

(A-C) WB detected the expression of IL-1 β under different inhibitors (D-F) The mRNA levels of pro-IL-1 β were detected by qRT-PCR at optimal inhibitor concentrations

2.7 RU.521 及rhIL-1 β 联合作用下hMPV病毒滴度及IL-1 β 蛋白表达

为了进一步验证IL-1 β 对hMPV感染作用的机制，我们检测了RU.521 后用补加rhIL-1 β 时hMPV病毒滴度及IL-1 β 的表达。如图 7A所示，RU.521 处理 24h后rhIL-1 β 再刺激 16HBE细胞 24h，再感染 10MOI hMPV48h，通过qRT-PCR检测hMPV病毒滴度，通过Western Blot检测IL-1 β 蛋白表达，我们发现当cGAS-STING通路受到抑制时，补加rhIL-1 β 后hMPV病毒滴度及IL-1 β 蛋白表达均不受影响。结果进一步表明IL-1 β 可通过cGAS-STING通路促进hMPV复制。

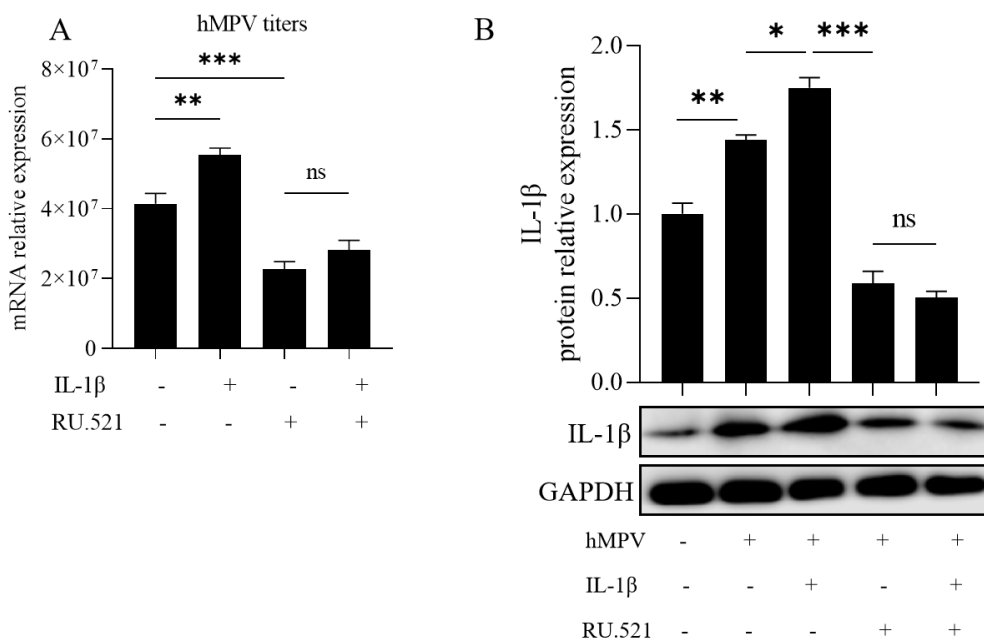


图 7 RU.521 处理后补加rhIL-1 β 不影响hMPV复制

(A) 采用qRT-PCR检测RU.521 和rhIL-1 β 处理与否时hMPV的病毒滴度 (B) WB 检测RU.521 和rhIL-1 β 处理与否时IL-1 β 的蛋白表达水平

(A) The expression level of hMPV titers was detected by qRT-PCR in the presence or absence of RU.521 or rhIL-1 β (B) The expression level of IL-1 β protein was detected by WB in the presence or absence of RU.521 or rhIL-1 β

2.8 I型干扰素 (IFN-Is) 的表达

如前所述，我们证明IL-1 β 可通过激活cGAS-STING通路从而促进hMPV复制。有研究表明，cGAS-STING通路激活可诱导IFN-Is的产生，而IFN-Is是先天免疫系统的主要抗病毒分子。为了研究IFN-Is在hMPV感染中发挥的作用，我们利用qRT-PCR检测了IFN-Is在 0、24、48 和 72h的表达。如图 8A-B所示，研究发现IFN- α 仅在 72h时显著升高，IFN- β 在 48h后升高。

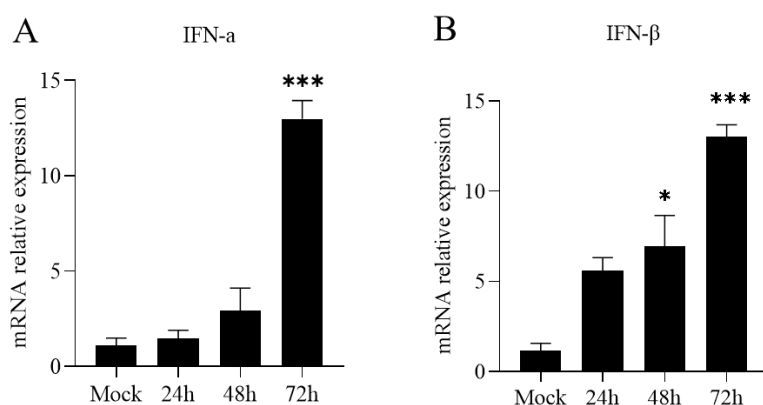


图 8 hMPV感染后I型干扰素(IFN-Is)的表达

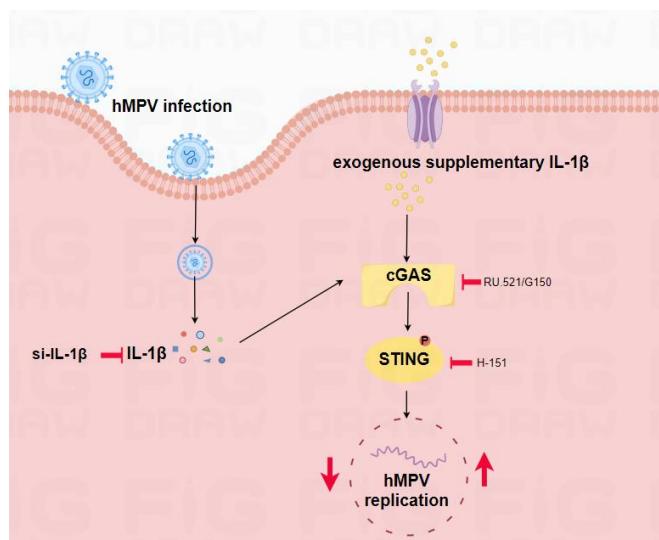
(A-B) qRT-PCR检测hMPV感染 0、24、48、72h后I型干扰素 (IFN- α 和IFN- β) mRNA水平

Figure 8 The expression of type I interferon with hMPV infection

(A-B) The lever of IFN- α and IFN- β mRNA at 0, 24, 48, and 72 hours after hMPV infection was measured by qRT-PCR

2.9 IL-1 β 通过cGAS-STING调控hMPV感染的机制研究示意图

根据上述实验结果绘制IL-1 β 在hMPV感染后发挥作用的机制研究示意图，如图 9 所示，IL-1 β 促进hMPV N蛋白复制，该过程有cGAS-STING通路参与。

图 9 IL-1 β 通过cGAS-STING调控hMPV感染的机制研究Figure 9 The mechanism of IL-1 β regulation of hMPV infection via cGAS-STING

3 讨论

目前,有关hMPV的研究主要集中在流行病学和临床层面,而对其在人体内的复制机制,特别是与关键免疫因子如IL-1 β 的相互作用,研究尚显不足。鉴于hMPV作为一种常见的呼吸道病毒,对公众健康构成的潜在威胁不容忽视,深入了解其感染通路显得至关重要。了解hMPV的感染通路,可以帮助我们更深入地理解病毒作用机制,从而更有效地预防和控制其感染。前期研究已证实IL-1 β 能促进hMPV复制,其具体的作用机制尚待深入探究。

在病原体感染期间,IL-1 β 发挥着关键作用,它能够引发线粒体mtDNA的释放,随后被cGAS-STING信号通路所识别,进而诱导干扰素(IFN)的产生,并指导一系列强效的先天免疫反应,以限制病原体的感染^[7, 34]。已知cGAS可以催化三磷酸鸟苷(GTP)和三磷酸腺苷(ATP)之间的反应,并激活STING以应对病毒

感染^[35]。过去的研究多集中在DNA病毒如单纯疱疹病毒 1 (HSV-1) 和卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (KSHV) 对cGAS的激活作用^[36]。然而, 最新研究表明, RNA病毒如登革热病毒 (DENV)、寨卡病毒 (ZIKV)、甲型流感病毒 (IAV) 等在感染期间同样能够激活cGAS-STING信号通路^[37-39]。特别值得注意的是, 有研究显示IL-1 β 介导的cGAS-STING途径对登革热病毒 (DENV) 或狂犬病病毒 (RABV) 的复制具有抑制作用^[7, 34]。这些发现不仅丰富了我们IL-1 β 与cGAS-STING通路相互作用的理解, 也为开发新的抗病毒策略提供了潜在的靶点。在本文中, 我们首先验证了hMPV感染能够诱导cGAS-STING信号通路的活化。然后, 我们检测了感染hMPV后IL-1 β 的敲低导致cGAS和STING磷酸化表达降低。相反, 外源性增加rhIL-1 β 能导致cGAS的表达和STING的磷酸化增加。此外, 我们利用cGAS抑制剂RU.521 来研究该途径对hMPV复制的影响。正如预期, RU.521 明显抑制了hMPV的复制。因此, 我们得出结论, IL-1 β 主要通过激活cGAS-STING途径促进hMPV的复制, 这与PCV2 和流感病毒相似^[40, 41]。

I型干扰素 (IFN-Is) 作为宿主抗病毒反应的重要组成部分, 能有效抑制病毒复制^[42-44]。研究表明, cGAS-STING通路可以触发IFN-Is的产生, 从而在宿主防御病毒入侵过程中发挥关键作用^[12]。根据课题组前期研究发现^[45, 46], 随着hMPV感染时间的延长, 96h后病毒复制明显减少。通过检测IFN-Is的表达, 我们发现IFN- α 仅在 72h时显著升高。在本文中, 我们的实验均在 48h内进行的, 因此IFN-Is可能在hMPV感染的晚期发挥抗病毒作用, 其发挥的具体作用有待进一步研究。

本研究的局限性是仅通过细胞模型来研究hMPV感染。然而, 这一模型仍具

有重要意义，因为上皮细胞不仅是抵抗病毒的前沿屏障，也是病毒复制的关键场所，是研究呼吸道感染不可或缺的模型^[47]。事实上，大多数关于呼吸道病毒的研究均聚焦于上皮细胞，其在触发和调节免疫系统功能中扮演重要角色^[48]。此外，已有研究证实IL-1 β 在上皮细胞与单核细胞间的通讯及病毒感染引发的炎症反应中发挥着关键作用^[49]。尽管体外实验无法完全模拟宿主在病毒感染后的全身免疫调节过程，但它为我们提供了一个病毒感染初期状态的近似状态。这些研究结果不仅有助于我们更好地理解IL-1 β 在hMPV感染中的作用，同时也为未来的药物研发提供了有益的启示。

4 小结

本研究发现IL-1 β 能够通过激活cGAS-STING信号通路从而促进hMPV的复制。这一发现不仅揭示了IL-1 β 在病毒感染过程中的新功能，也提示了cGAS-STING信号通路的活性可能是IL-1 β 表达的一个必要条件。

研究的不足之处

研究的不足之处:

- 1、由于hMPV感染可诱导机体分泌多种细胞因子,不同的细胞因子可诱导多种信号通路,因此需要进一步研究其他细胞因子在hMPV感染中的作用。
- 2、我们通过细胞实验研究了IL-1 β 对hMPV感染的特异性作用和机制,这并不能真正反映hMPV感染后宿主的全身免疫调节过程,如果使用相应的IL-1 β 敲基因小鼠进行hMPV复制能力的检测将进一步丰富我们的实验结论。
- 3、细胞因子IL-1 β 在病毒感染中可介导多条信号通路,需要排除IL-1 β 介导的其他通路在hMPV感染中发挥的作用。

全文总结

人偏肺病毒 (hMPV) 在医学界被广泛关注, 其在呼吸道疾病中扮演着重要的角色, 尤其对于儿童、老年人以及免疫系统较弱的人群来说, hMPV 的感染可能引发严重的健康问题。因此, 对于 hMPV 的研究不仅是理解其致病机制的关键, 更是开发有效治疗策略的基础。

本研究深入探索了 IL-1 β 与 hMPV 感染之间的相互关系, 并通过 Western Blot 及免疫荧光等方法揭示了 IL-1 β 通过 cGAS-STING 通路促进 hMPV 复制的分子机制。这一机制的发现, 不仅丰富了我们对于 hMPV 感染过程的理解, 同时也为开发新的治疗策略提供了潜在的靶点。具体来说, 我们的研究结果显示, hMPV 感染能够诱导宿主细胞产生 IL-1 β , 反过来 IL-1 β 又促进了 hMPV 的复制。

因此我们提出了抗 IL-1 β 的治疗策略。通过抑制 IL-1 β 的活性或表达, 我们可能能够有效阻断 hMPV 的复制, 从而达到治疗的目的。这一策略为 hMPV 感染的治疗提供了新的方向, 也为其他呼吸道病毒感染的治疗提供了借鉴。此外, 本研究不仅关注 hMPV 本身, 还将其置于更多呼吸道病毒感染背景中进行考察。我们认为 IL-1 β 可能在其他呼吸道病毒感染中也发挥着类似的作用。因此, 未来的研究将进一步探索 IL-1 β 在呼吸道病毒感染中的作用机制, 以期发现更多潜在的治疗靶点。

综上所述, 本研究不仅揭示了 IL-1 β 与 hMPV 感染之间的作用机制, 还为开发新的治疗策略提供了关键线索。我们期待在未来的研究中, 能够进一步深入探索呼吸道病毒感染的奥秘。

参考文献

- [1] van den Hoogen B G, de Jong J C, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease [J]. *Nat Med*, 2001, 7(6): 719-24.
- [2] Bai L, Zhao Y, Dong J, et al. Coinfection with influenza A virus enhances SARS-CoV-2 infectivity [J]. *Cell Res*, 2021, 31(4): 395-403.
- [3] Haddadin Z, Beveridge S, Fernandez K, et al. Respiratory Syncytial Virus Disease Severity in Young Children [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(11): e4384-e91.
- [4] Behnood S A, Shafran R, Bennett S D, et al. Persistent symptoms following SARS-CoV-2 infection amongst children and young people: A meta-analysis of controlled and uncontrolled studies [J]. *J Infect*, 2022, 84(2): 158-70.
- [5] Wang X, Li Y, Deloria-Knoll M, et al. Global burden of acute lower respiratory infection associated with human metapneumovirus in children under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study [J]. *Lancet Glob Health*, 2021, 9(1): e33-e43.
- [6] Rafiefard F, Yun Z, Orvell C. Epidemiologic characteristics and seasonal distribution of human metapneumovirus infections in five epidemic seasons in Stockholm, Sweden, 2002-2006 [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(9): 1631-8.
- [7] Wu D, Wang J, Huang C, et al. Interleukin-1 β suppresses rabies virus infection by activating cGAS-STING pathway and compromising the blood-brain barrier integrity in mice [J]. *Vet Microbiol*, 2023, 280: 109708.
- [8] Ma Z, Damania B. The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(2): 150-8.
- [9] Erttmann S F, Swacha P, Aung K M, et al. The gut microbiota prime systemic antiviral immunity via the cGAS-STING-IFN-I axis [J]. *Immunity*, 2022, 55(5): 847-61 e10.
- [10] Ding R, Li H, Liu Y, et al. Activating cGAS-STING axis contributes to

- neuroinflammation in CVST mouse model and induces inflammasome activation and microglia pyroptosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 137.
- [11] Reinert L S, Rashidi A S, Tran D N, et al. Brain immune cells undergo cGAS/STING-dependent apoptosis during herpes simplex virus type 1 infection to limit type I IFN production [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(1).
- [12] Domizio J D, Gulen M F, Saidoune F, et al. The cGAS-STING pathway drives type I IFN immunopathology in COVID-19 [J]. *Nature*, 2022, 603(7899): 145-51.
- [13] Ramos H J, Lanteri M C, Blahnik G, et al. IL-1beta signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(11): e1003039.
- [14] Panda S, Mohakud N K, Pena L, et al. Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen [J]. *Int J Infect Dis*, 2014, 25: 45-52.
- [15] Haas L E, Thijsen S F, van Elden L, et al. Human metapneumovirus in adults [J]. *Viruses*, 2013, 5(1): 87-110.
- [16] Yaseen M M, Abuharfeil N M, Darmani H. The role of IL-1beta during human immunodeficiency virus type 1 infection [J]. *Rev Med Virol*, 2023, 33(1): e2400.
- [17] Burdette B E, Esparza A N, Zhu H, et al. Gasdermin D in pyroptosis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(9): 2768-82.
- [18] Lei Q, Li T, Kong L, et al. HBV-Pol is crucial for HBV-mediated inhibition of inflammasome activation and IL-1beta production [J]. *Liver Int*, 2019, 39(12): 2273-84.
- [19] Uddin S, Thomas M. Human Metapneumovirus [M]. StatPearls. Treasure Island (FL). 2023.
- [20] Zhang W, Huang Z, Huang M, et al. Predicting Severe Enterovirus 71-Infected Hand, Foot, and Mouth Disease: Cytokines and Chemokines [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 9273241.
- [21] Cioccarelli C, Sanchez-Rodriguez R, Angioni R, et al. IL1beta Promotes TMPRSS2

- Expression and SARS-CoV-2 Cell Entry Through the p38 MAPK-GATA2 Axis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 781352.
- [22] Malmo J, Moe N, Krokstad S, et al. Cytokine Profiles in Human Metapneumovirus Infected Children: Identification of Genes Involved in the Antiviral Response and Pathogenesis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155484.
- [23] Park J S, Kim Y H, Kwon E, et al. Comparison of nasal cytokine profiles of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus [J]. *Asia Pac Allergy*, 2017, 7(4): 206-12.
- [24] Pan P, Shen M, Yu Z, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4664.
- [25] Vu L D, Phan A T Q, Hijano D R, et al. IL-1beta Promotes Expansion of IL-33(+) Lung Epithelial Stem Cells after Respiratory Syncytial Virus Infection during Infancy [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2022, 66(3): 312-22.
- [26] Browne E P. An interleukin-1 beta-encoding retrovirus exhibits enhanced replication in vivo [J]. *J Virol*, 2015, 89(1): 155-64.
- [27] Lawson K S, Prasad A, Groopman J E. Methamphetamine Enhances HIV-1 Replication in CD4(+) T-Cells via a Novel IL-1beta Auto-Regulatory Loop [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 136.
- [28] Delphin M, Faure-Dupuy S, Isorce N, et al. Inhibitory Effect of IL-1beta on HBV and HDV Replication and HBs Antigen-Dependent Modulation of Its Secretion by Macrophages [J]. *Viruses*, 2021, 14(1).
- [29] Koul P A, Saha S, Kaul K A, et al. Respiratory syncytial virus among children hospitalized with severe acute respiratory infection in Kashmir, a temperate region in northern India [J]. *J Glob Health*, 2022, 12: 04050.
- [30] Mahalingam S, Schwarze J, Zaid A, et al. Perspective on the host response to human metapneumovirus infection: what can we learn from respiratory syncytial virus infections? [J]. *Microbes Infect*, 2006, 8(1): 285-93.

- [31] Guo Q, Chen X, Chen J, et al. STING promotes senescence, apoptosis, and extracellular matrix degradation in osteoarthritis via the NF-kappaB signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 13.
- [32] Skopelja-Gardner S, An J, Elkon K B. Role of the cGAS-STING pathway in systemic and organ-specific diseases [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(9): 558-72.
- [33] Chen C, Xu P. Cellular functions of cGAS-STING signaling [J]. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(8): 630-48.
- [34] Aarreberg L D, Esser-Nobis K, Driscoll C, et al. Interleukin-1beta Induces mtDNA Release to Activate Innate Immune Signaling via cGAS-STING [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 801-15 e6.
- [35] Decout A, Katz J D, Venkatraman S, et al. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(9): 548-69.
- [36] Ni G, Ma Z, Wong J P, et al. PPP6C Negatively Regulates STING-Dependent Innate Immune Responses [J]. *mBio*, 2020, 11(4).
- [37] Li Y, Zhu Y, Feng S, et al. Macrophages activated by hepatitis B virus have distinct metabolic profiles and suppress the virus via IL-1beta to downregulate PPARalpha and FOXO3 [J]. *Cell Rep*, 2022, 38(4): 110284.
- [38] Liu X N, Li L W, Gao F, et al. cGAS Restricts PRRSV Replication by Sensing the mtDNA to Increase the cGAMP Activity [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 887054.
- [39] Su J, Shen S, Hu Y, et al. SARS-CoV-2 ORF3a inhibits cGAS-STING-mediated autophagy flux and antiviral function [J]. *J Med Virol*, 2023, 95(1): e28175.
- [40] Huang B, Zhang L, Lu M, et al. PCV2 infection activates the cGAS/STING signaling pathway to promote IFN-beta production and viral replication in PK-15 cells [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 227: 34-40.
- [41] Tang L, Liu X, Wang C, et al. USP18 promotes innate immune responses and apoptosis in influenza A virus-infected A549 cells via cGAS-STING pathway [J].

- Virology, 2023, 585: 240-7.
- [42] Hastings A K, Erickson J J, Schuster J E, et al. Role of type I interferon signaling in human metapneumovirus pathogenesis and control of viral replication [J]. J Virol, 2015, 89(8): 4405-20.
- [43] Lei X, Dong X, Ma R, et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2 [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3810.
- [44] Li C, Wang T, Zhang Y, et al. Evasion mechanisms of the type I interferons responses by influenza A virus [J]. Crit Rev Microbiol, 2020, 46(4): 420-32.
- [45] Li J, Zhao Y, Dai Y, et al. Identification of gamma-Fagarine as a novel antiviral agent against respiratory virus (hMPV) infection [J]. Virus Res, 2023, 336: 199223.
- [46] Zhang Y, Wu G, Yang Y, et al. Interleukin-4 Promotes Human Metapneumovirus Replication Through the JAK/STAT6 Pathway [J]. Viral Immunol, 2023.
- [47] Johnston S L, Goldblatt D L, Evans S E, et al. Airway Epithelial Innate Immunity [J]. Front Physiol, 2021, 12: 749077.
- [48] Schuler C F t, Malinczak C A, Best S K K, et al. Inhibition of uric acid or IL-1beta ameliorates respiratory syncytial virus immunopathology and development of asthma [J]. Allergy, 2020, 75(9): 2279-93.
- [49] Stokes C A, Ismail S, Dick E P, et al. Role of interleukin-1 and MyD88-dependent signaling in rhinovirus infection [J]. J Virol, 2011, 85(15): 7912-21.

文献综述

IL-1 β 在病毒感染中的研究现状

摘要：病毒是急性上呼吸道感染（ARTI）的最常见病原体。急性病毒性上呼吸道感染是由流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒等多种病毒引起的，回顾过去，2019 年爆发的COVID-19 无疑给全球带来严重的经济负担。人偏肺病毒（hMPV）于 2001 年被发现，此后世界各大洲 10 余个国家均有报道，其传播速度和感染范围不容忽视。呼吸道感染可诱导细胞因子IL-1 β 分泌，多项研究表明，IL-1 β 的释放能够激活免疫细胞，促进炎症反应，从而帮助机体清除病毒。然而，另一方面，过度的IL-1 β 分泌也可能导致炎症失控，加重组织损伤，甚至引发其他并发症。目前关于IL-1 β 对病毒的作用仍存在争议。因此，本文通过研究IL-1 β 在病毒感染的研究现状，为进一步研究病毒阻断、药物靶向干预治疗等提供关键线索，为hMPV病毒防治提供研究思路，以期更好地为易感儿童服务。

关键词：呼吸道病毒，人偏肺病毒，IL-1 β

1. 呼吸道感染

急性病毒性上呼吸道感染由多种病毒诱发，其中包括流感病毒、呼吸道合胞病毒（RSV）、人偏肺病毒及严重急性呼吸系统综合症冠状病毒 2（SARS-CoV2）^[1]。严重的病毒感染可引起急性呼吸衰竭，并迅速发展为急性呼吸窘迫综合征（ARDS），导致症状加重，尤其是在感染风险较高的人群中，包括老年人和患有

哮喘、糖尿病和慢性呼吸系统或心血管疾病等合并症的人^[2]。流感病毒作为一种急性病毒性呼吸道感染的主要诱因，其影响范围广泛，从轻微的上呼吸道炎症到致命的急性肺炎均有涉及，大流行期间更是与高死亡率紧密相连^[3]。据统计，每年流感影响全球近 10%的人口，导致约五十万人不幸离世^[4]。RSV是一种来自副粘病毒科的RNA病毒，其感染是北美儿童住院的重要原因，也是全球 1 岁以下婴儿死亡的主要原因之一，仅次于疟疾，目前针对RSV感染的有效治疗或预防措施仍相对匮乏^[5]。由SARS-CoV2 感染引起的 COVID-19 大流行，不仅对公共卫生造成重大冲击，也对全球经济产生了深远影响^[6]，其发病率高，死亡率高，已成为过去几个世纪对人类最重要的威胁之一^[7]。SARS-CoV2 感染可引起特征性的高炎症反应，引起血管损伤、微血管病、血管生成和广泛的血栓形成等^[8]。病毒和宿主因素都决定了病毒诱导的组织损伤的程度和疾病严重程度。

人偏肺病毒（hMPV）是新描述的Metapneumovirus属的成员，是副粘病毒科肺病毒亚科的重要呼吸道病原体^[9]。首次在患有不同呼吸综合征的幼儿呼吸道样本中被发现，如普通感冒、下呼吸道感染和哮喘加重等^[10]。hMPV由单个负链RNA组成，其基因组是 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'，共 8 个基因，可编码 9 种不同的蛋白质^[11]。研究表明，hMPV是一种全球性病原体，感染多见于 5 岁以下儿童，人类终生都会再次感染，这意味着由自然感染诱导的宿主免疫反应提供了不完全的保护^[12]。其引发的慢性炎症和促炎细胞因子水平升高是主要危险因素，hMPV感染后对免疫缺陷者、移植后病人、老人可能带来致死性后果^[13]。血清学调查显示其在人群中流行至少已超过 70 年，研究报道在呼吸道感染患者中的hMPV的检

测率从 1.5%到 43%不等, 存在地区差异^[14]。另一项研究表明在全球范围内, 5 岁以下儿童中估计有 1400 万人感染hMPV, 60 万人住院, 1.6 万多人死亡^[15]。2022 年 12 月和 2023 年 1 月hMPV感染出现高峰, 5.4%的成年患者和 12%的 0-4 岁儿童检出hMPV阳性^[16]。根据 2015 年新英格兰杂志发表的一项多中心、人群监测研究, 因肺炎住院的患儿中有 13%检出了hMPV^[17]。然而, 一直以来, hMPV的严重程度是被严重忽视的, 其感染通常都被认为是轻度病程, 但实际上hMPV和RSV具有相似的临床特征, 在儿童中都会引起低氧血症、发热、咳嗽、喘息, 且hMPV更容易导致发热^[18]。然而, 至今尚无有效的药物和疫苗来预防或治疗hMPV感染, 这使得对hMPV的重视程度亟待提升。

2. IL-1 β 的来源及其免疫功能

白细胞介素-1 β (IL-1 β) 是一种重要的细胞因子, 主要来源于活化的单核细胞和巨噬细胞^[19]。免疫细胞受细菌、病毒感染等外界刺激被激活, 进而释放IL-1 β , 在病毒、细菌、真菌和寄生虫感染的患者中发现IL-1 β 产生增加^[20]。此外, IL-1 β 也可以由其他细胞类型, 如内皮细胞、成纤维细胞和角质细胞等产生, 但其主要来源还是免疫细胞^[21]。其介导的疾病通常被称为“自身炎症”, 主要源于单核细胞和巨噬细胞的内源性分子驱动的IL-1 β 活性形式的释放。然而IL-1 β 活性受到严格控制, 需要通过有限的蛋白水解过程将无活性的IL-1 β 前体 (pro-IL-1 β) 转化为活性细胞因子。这一过程可以通过丝氨酸蛋白酶在细胞外进行, 特别是通过浸润中性粒细胞释放或通过半胱氨酸蛋白酶半胱天冬氨酸酶-1 在细胞内释放^[22]。病原体相关分子模式 (PAMPs) 通过巨噬细胞上的模式识别受体 (PRR) 识别无活性

的pro-IL-1 β 前体,进而调节控制基因表达的通路。进一步的PAMP或DAMP(危险相关分子模式)刺激能够诱导活性IL-1 β 分子的加工和分泌^[23]。在此过程中,ccaspase-1的活化是IL-1 β 成熟和释放的关键步骤,pro-IL-1 β 被caspase-1裂解,而NLRP3的PYD结构域通过与ASC的PYD结构域相互作用,促进caspase-1的激活。一旦caspase-1处理完成,成熟的IL-1 β 会迅速从细胞中分泌^[5,24,25]。

IL-1 β 水平的变化与多种疾病状态紧密相关,其升高不仅与动脉粥样硬化、2型糖尿病以及类风湿性关节炎、多发性硬化症和克罗恩病等自身免疫性疾病相关^[22]。在免疫功能方面,IL-1 β 的作用非常广泛,它能够激活和调节免疫细胞的活性,包括中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和T细胞等,提高机体对病原体的防御能力。作为炎症反应的中枢介质,IL-1 β 增加IL-6、细胞间粘附分子和血管细胞粘附分子的合成和释放,激活淋巴细胞并促进白细胞和嗜酸性粒细胞浸润到炎症部位^[26]。适量的IL-1 β 表达可以修复损伤,减少病毒增殖。然而,IL-1 β 表达过多会加剧炎症程度,从而增加发病率和死亡率。例如,在缺血性损伤如心肌梗死或中风的情况下,IL-1 β 的爆发可能诱发急性全身或局部炎症。而在动脉粥样硬化、2型糖尿病和骨关节炎等疾病中,IL-1 β 则与缓慢进展的炎症过程相关^[21]。此外,IL-1 β 在癌症的发生和发展中也扮演着重要的角色。作为免疫放大信号,它参与了癌症、心血管疾病以及多种自身免疫性和炎症性疾病的进展。特别是在慢性炎症的背景下,循环中高水平的IL-1 β 能够促进致癌介质的产生,从而诱导肿瘤的发生^[27]。因此,关键在于维持IL-1 β 在适当的水平,以平衡其益处与潜在的风险。总之,IL-1 β 在人类健康中扮演着双重角色,既参与机体对感染的防御,也可能成为某些

疾病发生和发展的关键因素。因此，深入了解IL-1 β 的调节机制，并探索其在疾病治疗中的潜在应用，对于维护人类健康具有重要意义。

3. IL-1 β 在病毒感染中的作用

在感染过程中，IL-1 β 的产生与先天抗菌素防御的开始同时发生，它对宿主反应和对病原体的抵抗力至关重要，其在呼吸道病毒感染中发挥着重要作用^[28]。首先，作为炎症反应的关键调节因子，IL-1 β 在呼吸道病毒感染的初期阶段就迅速响应，通过激活免疫细胞、诱导趋化因子和黏附分子的表达，以及促进炎症反应等方式，参与抗病毒免疫应答。在呼吸道病毒感染过程中，NLRP3 炎性小体识别PAMPs触发IL-1 β 的成熟和分泌的过程对于清除病毒感染的细胞、限制病毒复制以及促进机体恢复具有重要意义^[23]。然而，IL-1 β 的过度表达或不当调节也可能导致呼吸道病毒感染后的病理损伤。高水平的IL-1 β 可以引发过度的炎症反应，导致气道上皮细胞的损伤、黏液分泌过多以及气道高反应性等病理改变，从而加重呼吸道病毒感染的症状和病程。此外，IL-1 β 还可能影响呼吸道病毒感染后的免疫反应。一方面，它可以通过促进T细胞和B细胞的活化，增强机体的特异性免疫应答；另一方面，过度的IL-1 β 表达也可能导致免疫失衡，抑制抗病毒免疫应答的有效性^[26]。

病毒复制的调控对疾病的进展至关重要，IL-1 β 在不同病毒感染中扮演不同的角色。例如，抑制IL-1 β 受体可以改善RSV感染的新生小鼠肺部的炎症损伤^[29]。用特异性中和抗体中和IL-1 β 可有效减轻甲型流感病毒引起的呼吸道炎症。一项关于甲型流感病毒的研究发现，在抑制IL-1 β 受体后，由流感病毒引起的肺部病变显著减少，表明IL-1 β 是H1N1 流感病毒感染期间与肺部炎症相关的主要成分^[30]。其他

研究表明,用特异性中和抗体中和IL-1 α 和IL-1 β 可有效减少甲型流感病毒诱发的呼吸道炎症。然而,外源性添加IL-1 β 可以激活cGAS-STING信号通路诱导强大的先天免疫应答,从而抑制登革热病毒的复制^[31]。因此,目前尚不清楚IL-1 β 通路在病毒感染期间对宿主是有益还是有害^[32]。既往研究证明IL-1 β 可通过cGAS-STING途径诱导mtDNA释放从而激活先天免疫信号。该信号通路参与了多种DNA及RNA病毒的复制^[33]。SARS-COV-2 已被证明可激活cGAS-STING通路,抑制STING可减轻SARS-COV-2 引起的严重肺部炎症,改善疾病预后^[8]。泛素特异性肽酶 18 (USP18) 的过表达可通过cGAS-STING途径促进甲型流感病毒感染^[34]。猪环状病毒2型 (PCV2) 感染激活cGAS-STING信号通路,诱导IFN- β 的产生,敲除cGAS和STING,可减少病毒在PK-15 细胞中的复制^[35]。但cGAS-STING信号通路在hMPV感染中的作用尚未可知,IL-1 β 信号对hMPV感染细胞内在免疫的贡献尚未清楚。

因此,在呼吸道病毒感染的治疗过程中,合理调控IL-1 β 的表达水平对于减轻炎症反应、促进疾病恢复具有重要意义。未来研究可以进一步探索IL-1 β 在呼吸道病毒感染中的具体作用机制,以及开发针对IL-1 β 的特异性治疗策略,为呼吸道病毒感染的防治提供新的思路和方法。

参考文献

- [1] Moriyama M, Hugentobler W J, Iwasaki A. Seasonality of Respiratory Viral Infections [J]. *Annu Rev Virol*, 2020, 7(1): 83-101.
- [2] Cilloniz C, Pericas J M, Rojas J R, et al. Severe Infections Due to Respiratory Viruses [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2022, 43(1): 60-74.
- [3] Hutchinson E C. Influenza Virus [J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(9): 809-10.
- [4] Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, et al. A brief review of influenza virus infection [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(8): 4638-46.
- [5] Zheng L L, Li C M, Zhen S J, et al. A dynamic cell entry pathway of respiratory syncytial virus revealed by tracking the quantum dot-labeled single virus [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(23): 7880-7.
- [6] Jackson C B, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 3-20.
- [7] Giovanetti M, Benedetti F, Campisi G, et al. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 538: 88-91.
- [8] Neufeldt C J, Cerikan B, Cortese M, et al. SARS-CoV-2 infection induces a pro-inflammatory cytokine response through cGAS-STING and NF-kappaB [J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 45.
- [9] Haas L E, Thijsen S F, van Elden L, et al. Human metapneumovirus in adults [J]. *Viruses*, 2013, 5(1): 87-110.
- [10] Uche I K, Guerrero-Plata A. Interferon-Mediated Response to Human Metapneumovirus Infection [J]. *Viruses*, 2018, 10(9).
- [11] Hamelin M E, Prince G A, Gomez A M, et al. Human metapneumovirus infection induces long-term pulmonary inflammation associated with airway obstruction and hyperresponsiveness in mice [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(12): 1634-42.
- [12] Kikuta H. [Human metapneumovirus] [J]. *Uirusu*, 2006, 56(2): 173-81.

- [13] Wang X, Li Y, Deloria-Knoll M, et al. Global burden of acute lower respiratory infection associated with human metapneumovirus in children under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study [J]. *Lancet Glob Health*, 2021, 9(1): e33-e43.
- [14] Rafiefard F, Yun Z, Orvell C. Epidemiologic characteristics and seasonal distribution of human metapneumovirus infections in five epidemic seasons in Stockholm, Sweden, 2002-2006 [J]. *J Med Virol*, 2008, 80(9): 1631-8.
- [15] Uddin S, Thomas M. Human Metapneumovirus [M]. StatPearls. Treasure Island (FL). 2023.
- [16] Garcia-Garcia M L, Perez-Arenas E, Perez-Hernandez P, et al. Human Metapneumovirus Infections during COVID-19 Pandemic, Spain [J]. *Emerg Infect Dis*, 2023, 29(4): 850-2.
- [17] Jain S, Williams D J, Arnold S R, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(9): 835-45.
- [18] 谢嘉慧, 邝璐, 钟家禹, et al. 2018 年至 2021 年广州地区儿童急性呼吸道感染病原体的流行特征 [J]. *中华传染病杂志*, 2023, 41(2): 137-43.
- [19] Piccioli P, Rubartelli A. The secretion of IL-1beta and options for release [J]. *Semin Immunol*, 2013, 25(6): 425-9.
- [20] Kaivola J, Nyman T A, Matikainen S. Inflammasomes and SARS-CoV-2 Infection [J]. *Viruses*, 2021, 13(12).
- [21] Yun J H. Interleukin-1beta induces pericyte apoptosis via the NF-kappaB pathway in diabetic retinopathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 546: 46-53.
- [22] Dinarello C A. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(5): 1203-17.
- [23] Zhao C, Zhao W. NLRP3 Inflammasome-A Key Player in Antiviral Responses [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 211.
- [24] Haneklaus M, O'Neill L A. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation

- [J]. Immunol Rev, 2015, 265(1): 53-62.
- [25] Fu J, Wu H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation [J]. Annu Rev Immunol, 2023, 41: 301-16.
- [26] Gao P, Chen L, Fan L, et al. Newcastle disease virus RNA-induced IL-1beta expression via the NLRP3/caspase-1 inflammasome [J]. Vet Res, 2020, 51(1): 53.
- [27] Kaplanov I, Carmi Y, Kornetsky R, et al. Blocking IL-1beta reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(4): 1361-9.
- [28] Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(4): 189-95.
- [29] Schuler C F t, Malinczak C A, Best S K K, et al. Inhibition of uric acid or IL-1beta ameliorates respiratory syncytial virus immunopathology and development of asthma [J]. Allergy, 2020, 75(9): 2279-93.
- [30] Kim K S, Jung H, Shin I K, et al. Induction of interleukin-1 beta (IL-1beta) is a critical component of lung inflammation during influenza A (H1N1) virus infection [J]. J Med Virol, 2015, 87(7): 1104-12.
- [31] Aarreberg L D, Esser-Nobis K, Driscoll C, et al. Interleukin-1beta Induces mtDNA Release to Activate Innate Immune Signaling via cGAS-STING [J]. Mol Cell, 2019, 74(4): 801-15 e6.
- [32] Bent R, Moll L, Grabbe S, et al. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(8).
- [33] Ni G, Ma Z, Damania B. cGAS and STING: At the intersection of DNA and RNA virus-sensing networks [J]. PLoS Pathog, 2018, 14(8): e1007148.
- [34] Tang L, Liu X, Wang C, et al. USP18 promotes innate immune responses and apoptosis in influenza A virus-infected A549 cells via cGAS-STING pathway [J]. Virology, 2023, 585: 240-7.
- [35] Huang B, Zhang L, Lu M, et al. PCV2 infection activates the cGAS/STING signaling

pathway to promote IFN-beta production and viral replication in PK-15 cells [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 227: 34-40.