

雷帕霉素在甲型 H1N1 流感病毒感染中对糖酵解和炎症因子的调节作用

宋融融¹ 徐九洋² 刘智博² 曹彬¹

¹北京大学中日友好临床医学院, 北京 100029; ²中日友好医院呼吸与危重症医学科, 北京 100029

通信作者: 曹彬, Email: caobin_ben@163.com

【摘要】 目的 探讨免疫抑制剂雷帕霉素对流感病毒复制的影响及在流感病毒感染后调节糖酵解和炎症因子的作用。**方法** 本研究为实验研究, 采用甲型 H1N1 流感病毒株 A/PR/8 分别感染人肺泡上皮细胞系 A549 和永生化小鼠骨髓源巨噬细胞 (iBMDM), 构建流感病毒感染细胞模型。使用人非小细胞肺癌细胞系 A459 设置空白对照组、感染对照组、感染雷帕霉素组、感染二甲亚砷组, 在流感病毒感染及雷帕霉素处理 48 h 后, 使用空斑法和血凝法测定上清液病毒滴度, 定量聚合酶链反应法检测细胞内病毒基因、糖酵解相关基因 (PDK3、PKM、GAPDH、LDHA、HK2、PGAM1、PGK1) 和炎症因子干扰素 α (IFN- α)、Caspase-1、白细胞介素 (IL) -1 β 、IL-18、IL-6、IL-8、凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 基因相对量的表达。设置巨噬细胞空白对照组, 巨噬细胞感染对照组和巨噬细胞感染雷帕霉素组, 使用小鼠永生化骨髓巨噬细胞 (iBMDM) 在流感病毒感染及雷帕霉素处理 24 h 后, 酶联免疫吸附测定法检测上清肿瘤坏死因子 (TNF) - α 浓度。进行 3 次平行重复实验。**结果** 感染雷帕霉素组 A549 细胞上清中的病毒滴度与感染对照组、感染二甲亚砷组比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。感染雷帕霉素组 NP 基因 CT 值较感染对照组和感染二甲亚砷组升高, 分别为 [(17.50 $\pm$ 0.35) 比 (16.43 $\pm$ 0.12) 和 (16.52 $\pm$ 0.27)], 差异有统计学意义, 均 $P < 0.05$]; 感染对照组 A549 细胞上清中炎症因子基因 GAPDH、LDHA、HK2、PGAM1 表达量均较空白对照组上调, 分别为 [(2.34 $\pm$ 0.32) 比 (1.01 $\pm$ 0.16)、(2.43 $\pm$ 0.18) 比 (1.01 $\pm$ 0.18)、(2.63 $\pm$ 0.48) 比 (1.00 $\pm$ 0.06)、(17.97 $\pm$ 1.13) 比 (1.00 $\pm$ 0.09) 差异有统计学意义, 均 $P < 0.05$]; 与感染对照组相比, 感染雷帕霉素组下调了 GAPDH、LDHA、HK2、PGAM1 的相对表达量, 分别为 [(1.48 $\pm$ 0.19) 比 (2.34 $\pm$ 0.32)、(1.79 $\pm$ 0.09) 比 (2.43 $\pm$ 0.18)、(1.65 $\pm$ 0.28) 比 (2.63 $\pm$ 0.48)、(10.48 $\pm$ 0.81) 比 (17.97 $\pm$ 1.13)], 差异有统计学意义, 均 $P < 0.05$]; 感染雷帕霉素组基因 PDK3、PKM、PGK1 与感染对照组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)]。感染对照组 A549 细胞上清中 Caspase-1、IL-6、IL-8 基因的相对表达量较空白对照组上调, 分别为 [(47.02 $\pm$ 2.07) 比 (1.00 $\pm$ 0.09)、(17.59 $\pm$ 2.14) 比 (1.00 $\pm$ 0.04)、(3.86 $\pm$ 0.44) 比 (1.01 $\pm$ 0.19)], 差异有统计学意义, 均 $P < 0.05$]。以感染复数=20 流感病毒感染 iBMDM 细胞 24 h 后, 巨噬细胞感染对照组上清液中 TNF- α 的浓度较巨噬细胞空白对照组升高 (260.60 $\pm$ 38.90) ng/L 比 (44.96 $\pm$ 3.12) ng/L, 而巨噬细胞感染雷帕霉素组的 TNF- α 的浓度降低了 (132.20 $\pm$ 12.29) ng/L 比 (260.60 $\pm$ 38.90) ng/L, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** 雷帕霉素减少流感病毒 NP 蛋白基因在肺泡上皮细胞中的表达, 同时可有效减轻流感病毒感染引起的糖酵解通路激活, 并降低感染后巨噬细胞炎症反应。

【关键词】 流感病毒 A 型; 雷帕霉素; 糖酵解; 炎症因子

基金项目: 国家自然科学基金 (82200010); 中国医学科学院重大协同创新项目 (2021-I2M-1-048); 中国医学科学院呼吸病学研究院青年科学基金 (2023-ZF-13)

DOI:10.3760/cma.j.cn131368-20240102-00001

Regulatory role of rapamycin in glycolysis and inflammatory cytokines response during H1N1 influenza virus infection

Song Rongrong¹, Xu Jiuyang², Liu Zhibo², Cao Bin¹

¹Peking University China-Japan Friendship School of Clinical Medicine, Beijing 100029, China; ²Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Corresponding author: Cao Bin, Email: caobin_ben@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the immunosuppressant rapamycin on viral replication in influenza virus-infected cell, and to determine its role in regulating glycolysis pathway and inflammatory response during influenza virus infection. **Methods** This was an experimental study. Human alveolar epithelial cell A549 and iBMDM (immortalized murine bone marrow-derived macrophages) cell lines were infected with influenza virus A/H1N1/PR/8 to construct a cell model of influenza virus infection. Human non-small cell lung cancer cell line A459 was used to set up a blank control group, an infection control group, a rapamycin infection group, and a dimethyl sulfoxide infection group. At 48 hours post infection and rapamycin treatment, the cell culture supernatant virus titer was determined by plaque assay and hemagglutination assay; the expression levels of viral gene, glycolysis genes (PDK3, PKM, GAPDH, LDHA, HK2, PGAM1, and PGK1), and inflammatory factor interferon α , Caspase-1, Interleukin (IL)- 1β , IL-18, IL-6, IL-8, and apoptosis associated speckle like protein (ASC) genes were determined with real time quantitative PCR (RQ-PCR). A macrophage blank control group, a macrophage infection control group, and a macrophage rapamycin infection group were set up. At 24 hours post mouse iBMDM infection and rapamycin treatment, the supernatant cytokine tumor necrosis factor (TNF)- α in iBMDM culture was measured by ELISA. Three parallel replicate experiments were performed. **Results** There was no significant difference in viral titer in the supernatant of A549 cells between the rapamycin infection group and infection control group, rapamycin infection group and dimethyl sulfoxide infection group (both $P > 0.05$). The CT value of influenza virus NP gene in the rapamycin infection group was higher than that in the infection control group (17.50 ± 0.35 vs 16.43 ± 0.12) and in the dimethyl sulfoxide infection group (17.50 ± 0.35 vs 16.52 ± 0.27), with significant differences (both $P < 0.05$). The expressions of GAPDH, LDHA, HK2, and PGAM1 in the infection control group were up-regulated compared with those in the blank control group, with significant differences (2.34 ± 0.32 vs 1.01 ± 0.16 , 2.43 ± 0.18 vs 1.01 ± 0.18 , 2.63 ± 0.48 vs 1.00 ± 0.06 , 17.97 ± 1.13 vs 1.00 ± 0.09) (all $P < 0.05$). Compared with the infection control group, rapamycin treatment down-regulated the expressions of GAPDH, LDHA, HK2, and PGAM1, with significant differences (1.48 ± 0.19 vs 2.34 ± 0.32 , 1.79 ± 0.09 vs 2.43 ± 0.18 , 1.65 ± 0.28 vs 2.63 ± 0.48 , 10.48 ± 0.81 vs 17.97 ± 1.13) (all $P < 0.05$); there was no significant differences for PDK3, PKM, and PGK1 between the two groups ($P > 0.05$). The relative expressions of Caspase-1, IL-6, and IL-8 in the infection control group were up-regulated compared with the blank control group (47.02 ± 2.07 , 1.00 ± 0.09 , 17.59 ± 2.14 vs 1.00 ± 0.04 , 3.86 ± 0.44 vs 1.01 ± 0.19) (all $P < 0.05$). After 24 h of infection with influenza virus multiplicity of infection (MOI) = 20, the concentration of TNF- α in the cell supernatant of the macrophage infection group increased compared with that of the macrophage blank control group ($[260.60 \pm 38.90]$ ng/L vs $[44.96 \pm 3.12]$ ng/L), while the concentration of TNF- α in the rapamycin infection group was reduced, with significant differences ($[132.20 \pm 12.29]$ ng/L vs $[260.60 \pm 38.90]$ ng/L) (all $P < 0.05$). **Conclusions** Rapamycin reduces the expression of NP gene of influenza virus in alveolar epithelial cells, and can effectively reduce the up-regulation of glycolysis-related enzyme genes caused by influenza virus infection, as well as reduce the inflammatory response of macrophages after infection.

【Key words】 Influenza A virus; Rapamycin; Glycolysis; Inflammatory cytokines

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82200010); Major Collaborative Innovation Project of Chinese Academy of Medical Sciences (2021-I2M-1-048); Youth Science

Foundation, Institute of Respiratory Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences (2023-ZF-13)

DOI:10.3760/cma.j.cn131368-20240102-00001

流行性感冒（流感）是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病，每年导致全球约 29 万~65 万例呼吸道疾病相关死亡^[1]。其中，重症流感的病死率较高，而现有的抗病毒治疗药物如奥司他韦等单独应用对重症流感疗效欠佳。在重症流感病程中，过度激活的免疫反应是导致患者死亡的主要原因^[2]，在抗病毒治疗的同时联合免疫调节治疗（如糖皮质激素）可降低病死率^[3]，近年来糖皮质激素在重症新型冠状病毒感染治疗中也已获得广泛应用^[4]。但糖皮质激素的抗炎靶点非常广泛，且大剂量应用时可能会有较多不良反应，反而造成不良临床结局^[5]。因此，临床需寻找一种新的重症流感辅助免疫调节治疗方法。

雷帕霉素是用于器官移植患者术后抗排斥治疗的免疫抑制剂，其衍生物在某些肿瘤的治疗中也有应用，此外研究还发现雷帕霉素具有延长若干种动物寿命^[6-8]和免疫调节作用^[9]。近期有个案报道显示，在重症流感病毒和禽流感病毒感染病例中联合使用雷帕霉素和抗病毒药物（在重症流感中再加用糖皮质激素）可改善患者预后^[10-11]。此前也有随机对照临床研究显示，早期糖皮质激素联合雷帕霉素的应用可以改善重症甲型 H1N1 流感患者的预后，缩短呼吸机使用时间^[12]。但是，雷帕霉素在治疗重症流感感染中的具体机制尚不清楚。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）是雷帕霉素的作用靶点。它是一种保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，其介导的 mTOR 信号通路参与细胞内许多重要的生物学过程，包括糖代谢、线粒体代谢、蛋白质合成、核酸合成和脂质代谢等^[13]。流感病毒感染可能导致细胞中的这些代谢相关通路发生改变，而抑制这些代谢通路的激活可能也会降低重症流感的病死率^[14]。雷帕霉素是否通过抑制糖酵解等代谢通路激活减轻重症流感损伤有待探究。本研究通过构建流感病毒感染的细胞模型，分别从雷帕霉素对于流感病毒复制的影响、对糖酵解相关酶基因表达和炎性因子的调控角度，对雷帕霉素治疗重症流感潜在的机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞及病毒培养 人非小细胞肺癌细胞（A549）及犬肾细胞（MDCK）购自武汉普诺赛生命科技有限公司，小鼠永生化骨髓巨噬细胞（iBMDM）为北京生命科学研究所以邵峰实验室惠

赠，均在 DMEM 高糖培养基+10% 胎牛血清+1% 青霉素-链霉素（美国 Gibco 公司）中于 37℃、5% CO₂ 环境培养。甲型 H1N1 流感病毒株 A/PR/8 由本实验室保存并在鸡胚中传代^[15]。

1.2 其他材料 雷帕霉素、Cell Counting Kit-8（CCK8）试剂盒购自美国 MCE 公司，雷帕霉素以二甲亚砜溶解保存。RNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司，逆转录试剂购自日本 TaKaRa 公司，定量聚合酶链反应（quantitative PCR, qPCR）预混液购自美国 Thermo 公司，小鼠肿瘤坏死因子 α（tumor necrosis factor, TNF-α）酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）试剂盒购自杭州联科生物技术公司。

1.3 细胞活性检测 iBMDM 和 A549 细胞培养至对数生长期，以每孔 100 μl 培养基、3×10³ 细胞接种于 96 孔板，培养过夜后进行实验。细胞上清液更换为含有 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ mmol/L 雷帕霉素的完全培养基（DMEM+10% 胎牛血清+1% 青霉素-链霉素），对照组加入不含药物的完全培养基，每组设置 6 个平行孔。iBMDM 和 A549 分别培养 24 h 或 48 h 后，将细胞上清更换为含 10% CCK8 的完全培养基，放入培养箱培养 2~4 h，用酶标仪检测 450 nm 下的吸光度值。

1.4 流感病毒感染和雷帕霉素处理

1.4.1 A549 流感模型建立及处理 将 A549 细胞以 6×10⁵ 个/T25 培养瓶铺板并培养过夜，设置空白对照组、感染对照组、感染二甲亚砜组和感染雷帕霉素组。感染对照组加入甲型 H1N1 流感病毒株 A/PR/8，感染复数（multiplicity of infection, MOI）为 10；感染雷帕霉素组以相同剂量流感病毒感染，孵育 1.5 h 后在培养基中加入雷帕霉素使其终浓度为 1 μmol/L；感染二甲亚砜组在病毒感染孵育 1.5 h 后培养基中加入等量稀释的雷帕霉素溶剂二甲亚砜。均在感染或处理 48 h 后收样。

1.4.2 iBMDM 流感模型建立及处理 将 iBMDM 细胞以 7.5×10⁶ 个/T25 培养瓶铺板，设置空白对照组、感染对照组和感染雷帕霉素组。待细胞贴壁后用流感病毒 A/PR/8 以 MOI=20 感染，感染或处理 24 h 后收样，其余条件同前。

1.5 流感病毒滴度测定

1.5.1 血凝法 在 V 型 96 孔板中加入原液、2

倍、4 倍、8 倍、16 倍稀释的待测样品（每孔 50 μ l），再分别向每孔加入 50 μ l 的 1% 鸡红细胞悬液（广州鸿泉生物科技有限公司），静置 40 min 后观察红细胞凝集情况。

1.5.2 空斑法 将 MDCK 细胞种于 12 孔板培养过夜，次日弃上清，用 PBS 清洗细胞 2 次，分别加入 10 倍稀释的病毒液 200 μ l，每个梯度设置 2 个平行孔， 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 的病毒的稀释梯，置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 1.5 h。孵育结束后吸去病毒稀释液，将 2% 琼脂糖与覆盖营养液 [1.43XMEM+0.3% 牛血清白蛋白+2.86 mmol/L L-谷氨酰胺+0.21% 碳酸氢钠+14.29 mmol/L HEPES+1% 青霉素-链霉素（美国 Gibco 公司）0.01% DEAE Dextran 美国 BioRuler 公司] 混合后加入孔内，冷却凝固后倒置放入培养箱，培养 72 h 后去除孔内凝胶，用龙胆紫溶液染色后清洗，观察空斑形成。

1.6 qPCR 检测基因表达 使用 qPCR 法测定细胞中病毒 NP 基因的表达式。弃去细胞培养上清，用试剂盒提取细胞 RNA 并进行逆转录。使用 SYBR Green 法进行实时荧光定量 PCR，以 β -actin 为内参，采用 $\Delta\Delta$ CT 法计算病毒 NP 基因表达量以及糖酵解相关基因（PDK3、PKM、GAPDH、LDHA、HK2、PGAM1、PGK1）和炎症因子 [干扰素 α （interferon- α ，IFN- α ）、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、IL-6、凋亡相关斑点样蛋白（apoptosis-associated speck-like protein，ASC）、IL-8] 基因的相对表达量，每个样本设置 3 个平行孔。

1.7 ELISA 检测细胞上清炎症因子 按照试剂盒说明书所示步骤测定感染后 iBMDM 细胞上清中 TNF- α 浓度，每个样本设置 2 个平行孔。

1.8 统计学分析 应用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学处理，计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验，满足正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 Tukey's 法。不满足正态分布或方差不齐的数据以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示，多组比较采用 Kruskal-Wallis 检验，组间两两比较采用 Dunn's 法。所有实验进行 3 次重复。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷帕霉素对细胞生长的影响 采用 CCK8 法分别测定不同浓度雷帕霉素对 A549（处理 48 h）和 iBMDM（处理 24 h）细胞生长的影响。当雷帕霉素浓度不超过 10^{-3} mmol/L 时，不同浓度雷帕霉素处理对 iBMDM 和 A549 细胞生长影响相近，因此，最终选取 10^{-3} mmol/L（1 μ mol/L）作为处理浓度。见表 1。

2.2 肺泡上皮细胞中流感病毒复制 分别使用空斑法、血凝法测定以 MOI=10 感染 48 h 后细胞上清液中病毒滴度，感染雷帕霉素组细胞上清中的病毒滴度与感染对照组、感染二甲亚砜组差异无统计学意义（均 $P > 0.05$ ），感染雷帕霉素组细胞中流感病毒 NP 基因 CT 值 [CT 值（ 17.50 ± 0.35 ）] 比感染对照组 [CT 值（ 16.43 ± 0.12 ）]、感染二甲亚砜组 [CT 值（ 16.52 ± 0.27 ）] 升高（均 $P < 0.05$ ），见图 1、2，表 2。

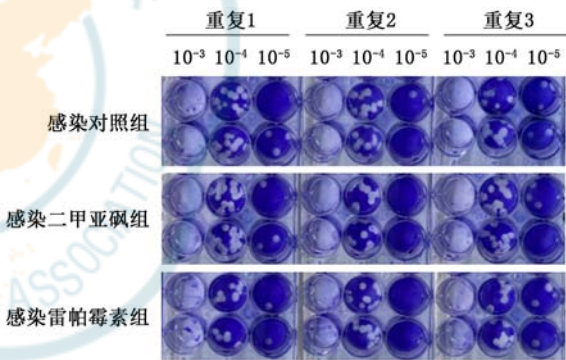


图 1 空斑法测定流感病毒感染后 48 h 不同处理组 A549 细胞上清液病毒滴度

2.3 流感病毒感染后肺泡上皮细胞糖酵解相关酶基因表达 以流感病毒 MOI=10 感染 A549 细胞 48 h 后，qPCR 法检测细胞内糖酵解基因表达量，以内参基因 β -actin 作为对照计算与空白对照组的相对表达量。在流感病毒感染后，感染对照组 GAPDH [（ 2.34 ± 0.32 ）比（ 1.01 ± 0.16 ）]、LDHA [（ 2.43 ± 0.18 ）比（ 1.01 ± 0.18 ）]、HK2 [（ 2.63 ± 0.48 ）比（ 1.00 ± 0.06 ）] 和 PGAM1 [（ 17.97 ± 1.13 ）比（ 1.00 ± 0.09 ）] 基因的表达较空白对照组上调（均 $P < 0.05$ ）；与感

表 1 A549 和 iBMDM 细胞经不同浓度雷帕霉素处理后的细胞存活率（%， $\bar{x} \pm s$ ）

细胞	10^{-1} mmol/L	10^{-2} mmol/L	10^{-3} mmol/L	10^{-4} mmol/L	10^{-5} mmol/L	10^{-6} mmol/L
A549	9.47 ± 3.27	77.43 ± 7.46	76.81 ± 9.47	73.80 ± 5.85	73.00 ± 10.53	79.16 ± 9.10
iBMDM	-2.00 ± 1.08	51.11 ± 4.43	69.50 ± 10.93	67.78 ± 9.70	71.14 ± 11.76	72.07 ± 9.51

注：A549 为人非小细胞肺癌细胞；iBMDM 为小鼠永生化骨髓巨噬细胞

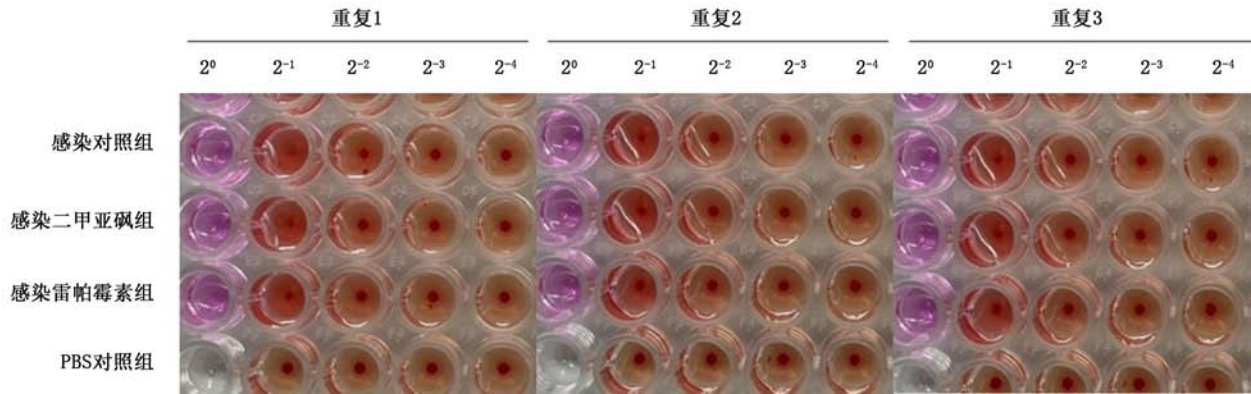


图 2 血凝法测定流感病毒感染后 48 h 不同处理组 A549 细胞上清液病毒滴度

染对照组相比，感染雷帕霉素组较感染对照组降低，GAPDH $[(1.48 \pm 0.19) \text{ 比 } (2.34 \pm 0.32)]$ 、LDHA $[(1.79 \pm 0.09) \text{ 比 } (2.43 \pm 0.18)]$ 、HK 2 $[(1.65 \pm 0.28) \text{ 比 } (2.63 \pm 0.48)]$ 和 PGAM1 $[(10.48 \pm 0.81) \text{ 比 } (17.97 \pm 1.13)]$ (均 $P < 0.05$)。而对于基因 PDK3 $[(0.37 \pm 0.05) \text{ 比 } (0.47 \pm 0.02)]$ ，PKM $[(0.70 \pm 0.07) \text{ 比 } (0.84 \pm 0.08)]$ ，PGK1 $[0.46 (0.41, 0.48) \text{ 比 } 0.80 (0.78, 0.86)]$ 感染雷帕霉素组与感染对照组相比则差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。见表 3。

2.4 流感病毒感染后肺泡上皮细胞炎症因子基因表达 流感病毒感染 48 h 后，感染对照组以下基因相对表达量较空白对照组上调：Caspase-1 $[(47.02 \pm 2.07) \text{ 比 } (1.00 \pm 0.09)]$ 、IL-6 $[(17.59 \pm 2.14) \text{ 比 } (1.00 \pm 0.04)]$ 、IL-8 $[(3.86 \pm 0.44) \text{ 比 } (1.01 \pm 0.19)]$ (均 $P < 0.05$)。此外，感染雷帕霉素组细胞中的 ASC

$[(1.68 \pm 0.13) \text{ 比 } (1.10 \pm 0.03)]$ 、Caspase-1 $[(59.97 \pm 6.11) \text{ 比 } (47.02 \pm 2.07)]$ 基因相对表达量较感染对照组进一步上调 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 流感病毒感染后巨噬细胞巨噬细胞 TNF- α 分泌 ELISA 结果显示，以 MOI=20 流感病毒感染 iBMDM 细胞 24 h，巨噬细胞感染对照组细胞上清液中 TNF- α 的浓度较巨噬细胞空白对照组升高 $(260.60 \pm 38.90) \text{ ng/L}$ 比 $(44.96 \pm 3.12) \text{ ng/L}$ ，而巨噬细胞感染雷帕霉素组则部分降低了 $(132.20 \pm 12.29) \text{ ng/L}$ 比 $(260.60 \pm 38.90) \text{ ng/L}$ 上清中 TNF- α 的浓度 (均 $P < 0.05$)。见表 5。

3 讨论

虽然近年来有许多新型抗病毒药物上市^[16]，但是流感的疾病负担仍然较重，特别是重症流感临床救治的手段仍有限。目前认为重症流感的致病机制除病毒的直接破坏外，还包括病毒感染造成的免疫反应失衡，进一步造成免疫病理损伤^[17]。因此，在重症流感的治疗中需联合免疫调节治疗。雷帕霉

表 2 流感病毒感染后 48 h 不同处理组 A549 细胞病毒复制情况

组别	次数	上清液病毒滴度 $[\log_{10}, M(Q_1, Q_3)]$	细胞内 NP 基因 CT 值 $(\bar{x} \pm s)$	内参基因 CT 值 $(\bar{x} \pm s)$
感染对照组	3	5.70(5.63, 5.74)	16.43 $\pm$ 0.12	22.16 $\pm$ 0.02
感染二甲亚砜组	3	5.81(5.68, 5.81)	16.52 $\pm$ 0.27	21.95 $\pm$ 0.15
感染雷帕霉素组	3	5.54(5.54, 5.68)	17.50 $\pm$ 0.35 ^{ab}	22.53 $\pm$ 0.25 ^b
统计值		$H = 4.54$	$F = 15.28$	$F = 9.24$
P 值		0.111	0.004	0.015

注：与感染对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与感染二甲亚砜组比较，^b $P < 0.05$

表 3 流感病毒感染 48 h 后不同处理组 A549 细胞糖酵解相关基因的相对表达量

组别	次数	PDK3 $(\bar{x} \pm s)$	PKM $(\bar{x} \pm s)$	GAPDH $(\bar{x} \pm s)$	LDHA $(\bar{x} \pm s)$	HK2 $(\bar{x} \pm s)$	PGAM1 $(\bar{x} \pm s)$	PGK1 $[M(Q_1, Q_3)]$
空白对照组	3	1.01 $\pm$ 0.15	1.01 $\pm$ 0.17	1.01 $\pm$ 0.16	1.01 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.09	1.09(0.85, 1.09)
感染对照组	3	0.47 $\pm$ 0.02 ^a	0.84 $\pm$ 0.08	2.34 $\pm$ 0.32 ^a	2.43 $\pm$ 0.18 ^a	2.63 $\pm$ 0.48 ^a	17.97 $\pm$ 1.13 ^a	0.80(0.78, 0.86)
感染雷帕霉素组	3	0.37 $\pm$ 0.05 ^a	0.70 $\pm$ 0.07 ^a	1.48 $\pm$ 0.19 ^b	1.79 $\pm$ 0.09 ^{ab}	1.65 $\pm$ 0.28 ^b	10.48 $\pm$ 0.81 ^{ab}	0.46(0.41, 0.48) ^a
统计值		$F = 40.01$	$F = 5.38$	$F = 24.37$	$F = 62.62$	$F = 19.46$	$F = 335.90$	$H = 6.49$
P 值		< 0.001	0.046	0.001	< 0.001	0.002	< 0.001	0.011

注：与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与感染对照组比较，^b $P < 0.05$

表 4 流感病毒感染后 48 h 不同处理组 A549 细胞炎症因子基因的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	次数	IFN- α	Caspase-1	IL-1 β	IL-18	IL-6	ASC	IL-8
空白对照组	3	1.01 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.09	1.01 $\pm$ 0.16	1.01 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.04	1.02 $\pm$ 0.26	1.01 $\pm$ 0.19
感染对照组	3	0.70 $\pm$ 0.08 ^a	47.02 $\pm$ 2.07 ^a	1.25 $\pm$ 0.22	0.52 $\pm$ 0.02 ^a	17.59 $\pm$ 2.14 ^a	1.10 $\pm$ 0.03	3.86 $\pm$ 0.44 ^a
感染雷帕霉素组	3	0.90 $\pm$ 0.01	59.97 $\pm$ 6.11 ^{ab}	1.22 $\pm$ 0.20	0.72 $\pm$ 0.04 ^a	21.67 $\pm$ 3.11 ^a	1.68 $\pm$ 0.13 ^{ab}	3.89 $\pm$ 0.56 ^a
F 值		6.75	207.80	1.33	13.81	75.51	13.61	44.49
P 值		0.029	<0.001	0.332	0.006	<0.001	0.006	<0.001

注：IFN- α 为干扰素 α ，IL-1 β 为白细胞介素 1 β ，ABC 为凋亡相关半胱蛋白；与空白对照组比较，^a P < 0.05；与感染对照组比较，^b P < 0.05

素是近年来受到广泛关注的免疫调节药物，已有病例报告和小规模的临床研究显示在重症流感治疗中雷帕霉素可能发挥重要作用^[10-12]，但雷帕霉素治疗的具体机制尚不明确。本文通过构建甲型流感病毒感染的体外上皮细胞、巨噬细胞模型，发现雷帕霉素可能部分降低流感病毒在上皮细胞中的复制，减少巨噬细胞炎症因子释放，并改变流感病毒感染细胞的糖代谢激活状态，为进一步探究雷帕霉素作用的分子机制打下基础。

表 5 流感病毒感染后 24 h 不同处理组 iBMDM 细胞上清液 TNF- α 浓度 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	次数	TNF- α
巨噬细胞空白对照组	3	44.96 $\pm$ 3.12
巨噬细胞感染对照组	3	260.60 $\pm$ 38.90 ^a
巨噬细胞感染雷帕霉素组	3	132.20 $\pm$ 12.29 ^{ab}
F 值		63.26
P 值		<0.001

注：TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ；与巨噬细胞空白对照组比较，^a P < 0.05；与巨噬细胞感染对照组比较，^b P < 0.05

雷帕霉素是一种常用的免疫抑制剂，因此有观点担心在流感病毒感染后雷帕霉素可能会促进流感病毒的复制。本研究发现，雷帕霉素不但未增加呼吸道上皮细胞中流感病毒的复制，流感感染 A459 细胞后 48 h 细胞中病毒 NP 蛋白基因表达在雷帕霉素处理后轻度下降。既往有研究表明，流感病毒通过 HA 蛋白激活 mTORC1，从而增加病毒蛋白的表达^[18]，而雷帕霉素恰好是 mTORC1 的抑制剂，故有可能降低病毒复制。初步的临床研究也提示，雷帕霉素可加快流感病毒清除^[12]。但本研究仅在体外的上皮细胞模型中进行探究，还需进一步在动物实验中验证雷帕霉素影响病毒复制的作用，以及对于适应性免疫细胞的影响。

对于雷帕霉素作用机制的讨论，大多集中在调节感染后过度激活的炎症反应。在流感病毒感染的急性期，巨噬细胞会释放大量的促炎因子^[19-21]，其中 TNF- α 作为一种重要的促炎因子促进免疫应答^[22]，而过度分泌的 TNF- α 则会导致肺部严重的病理损伤。本课题组的前期研究显示，雷帕霉素联

合奥司他韦治疗重症 H1N1 流感感染小鼠，可减轻小鼠肺部病理损伤，其机制可能与减轻 NLRP3 炎症小体的激活有关^[23]。本研究结果亦显示，雷帕霉素处理巨噬细胞后，可减少流感病毒感染诱导的 TNF- α 分泌，进而减轻炎症反应；但是在上皮细胞模型中，未观察到雷帕霉素对于炎症因子相关基因表达量的抑制作用，反而观察到雷帕霉素处理可进一步上调部分炎症因子的表达。这可能与不同细胞类型的作用不同有关，需进一步在体内实验中进行观察验证，通过细胞分选或单细胞测序方法，进一步探究雷帕霉素对于不同类型细胞的影响。

当机体发生炎症反应时，细胞内发生糖代谢重塑，糖酵解途径增强，这一现象被称为 Warburg 效应，最早在肿瘤中发现^[24-25]；不难理解，在感染后的炎症反应中，由于中性粒细胞、T 细胞、M1 型巨噬细胞等促炎细胞都需要大量能量，糖酵解通路会被激活^[24,26]。已知流感病毒感染后细胞中一系列细胞代谢通路发生改变^[27]，包括糖代谢、氨基酸代谢、脂肪代谢等。以甲型 H1N1 流感病毒感染肺泡上皮细胞后，观察到缺氧诱导因子 1 信号通路被激活，进一步促进细胞糖酵解过程以及病毒复制，因此该通路中的缺氧诱导因子 1-糖酵解信号通路也被看作是治疗甲型 H1N1 流感感染的靶点之一^[28]。因此，改变糖酵解通路的激活状态，可能会调节感染后过度激活的炎症状态，并且抑制流感病毒的复制。通过动物模型中探究糖酵解抑制剂对于病毒复制、炎症反应的影响，可进一步回答这个问题。此外，还可通过构建基因敲除或敲低模型，在体外进一步探究定位糖酵解通路中影响流感病毒复制和炎症反应的关键分子靶点。

糖酵解通路可能还与其他细胞功能调节有关，值得进一步研究。近期有研究发现，在脂多糖刺激的免疫细胞模型中，IFN- γ 通过增强 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活促进 Warburg 效应，进而逆转脓毒症所导致的免疫抑制^[29]；雷帕霉素治疗同时也可逆转真菌感染后机体的免疫抑制状态^[30]。此外，糖酵解在肺泡上皮再生和修复中也起重要作用

用^[31]，雷帕霉素处理是否也影响了感染后肺泡上皮的修复，有待进一步探索。

除重症流感外，其他病毒性肺炎中可能也存在糖酵解的上调，并与过度激活的免疫反应相关联，雷帕霉素不仅可以用于重症流感的治疗，也可能用于其他病毒性肺炎所致的免疫反应过度激活和细胞因子风暴的治疗。同时，其他代谢过程如线粒体内部代谢，脂质代谢和蛋白质代谢的改变也可能发生在重症病毒性肺炎过程中，以这些代谢改变为靶点的针对宿主的治疗也可能成为调节重症病毒性肺炎中过度激活的免疫反应和细胞因子风暴的新方向。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 宋融融：实验操作、论文撰写；徐九洋：统计学分析、论文修改；刘智博、曹彬：研究指导、审阅稿件、经费支持

参 考 文 献

[1] Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: A modelling study [J]. *Lancet*, 2018, 391 (10127): 1285-1300. DOI:10.1016/S0140-6736(17)33293-2.

[2] Gu Y, Zuo X, Zhang S, et al. The mechanism behind influenza virus cytokine storm [J]. *Viruses*, 2021, 13 (7): 1362. DOI: 10.3390/v13071362.

[3] Li H, Yang SG, Gu L, et al. Effect of low-to-moderate-dose corticosteroids on mortality of hospitalized adolescents and adults with influenza A (H1N1) pdm09 viral pneumonia [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2017, 11 (4): 345-354. DOI: 10.1111/irv.12456.

[4] Group RC, Horby P, Lim WS, et al. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(8):693-704. DOI:10.1056/NEJMoa2021436.

[5] Cao B, Gao H, Zhou B, et al. Adjuvant corticosteroid treatment in adults with influenza A (H7N9) viral pneumonia [J]. *Crit Care Med*, 2016, 44 (6): e318-e328. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001616.

[6] Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: One drug, many effects [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(3):373-379. DOI:10.1016/j.cmet.2014.01.001.

[7] Zhang Y, Zhang J, Wang S. The role of rapamycin in healthspan extension via the delay of organ aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 70 101376. DOI: 10.1016/j.arr.2021.101376.

[8] Panwar V, Singh A, Bhatt M, et al. Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):375. DOI:10.1038/s41392-023-01608-z.

[9] Soltani A, Bahreyni A, Boroumand N, et al. Therapeutic potency of mTOR signaling pharmacological inhibitors in the treatment of proinflammatory diseases, current status, and perspectives [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (6): 4783-4790. DOI:10.1002/jcp.26276.

[10] Suo L, Yu X, Hu Y, et al. Sirolimus combined with oseltamivir and corticosteroid treatment for a puerpera with severe pneumonia caused by 2009 pandemic H1N1: A case report [J]. *Biosaf Health*, 2021, 3(6):343-350. DOI:10.1016/j.bsheal.2021.11.003.

[11] Zeng Q, Wang J, Zhang X, et al. Successful combinatorial therapy of sirolimus and neuraminidase inhibitors in a patient with highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: A case report [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10 (5): 265. DOI: 10.21037/atm-22-704.

[12] Wang CH, Chung FT, Lin SM, et al. Adjuvant treatment with a mammalian target of rapamycin inhibitor, sirolimus, and steroids improves outcomes in patients with severe H1N1 pneumonia and acute respiratory failure [J]. *Crit Care Med*, 2014, 42(2):313-321. DOI:10.1097/CCM.0b013e3182a2727d.

[13] Szwed A, Kim E, Jacinto E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2 [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(3):1371-1426. DOI:10.1152/physrev.00026.2020.

[14] Smallwood HS, Duan S, Morfouace M, et al. Targeting metabolic reprogramming by influenza infection for therapeutic intervention [J]. *Cell Rep*, 2017, 19 (8): 1640-1653. DOI:10.1016/j.celrep.2017.04.039.

[15] Jia J, Li H, Huang Z, et al. Comprehensive immune landscape of lung-resident memory CD8⁺ T cells after influenza infection and reinfection in a mouse model [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1184884. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1184884.

[16] 宋融融, 徐九洋, 刘红玉, 等. 流感抗病毒药物治疗进展 [J]. *中华医学杂志*, 2023, 103 (4): 293-299. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20220602-01230.

[17] Xu J, Yu J, Yang L, et al. Influenza virus in community-acquired pneumonia: Current understanding and knowledge gaps [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2020, 41 (4): 555-567. DOI:10.1055/s-0040-1710584.

[18] Kuss-Duerkop SK, Wang J, Mena I, et al. Influenza virus differentially activates mTORC1 and mTORC2 signaling to maximize late stage replication [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13 (9): e1006635. DOI:10.1371/journal.ppat.1006635.

[19] Morris G, Bortolasci CC, Puri BK, et al. The cytokine storms of COVID-19, H1N1 influenza, CRS and MAS compared. Can one sized treatment fit all? [J]. *Cytokine*, 2021, 144: 155593. DOI:10.1016/j.cyto.2021.155593.

[20] Guo XJ, Thomas PG. New fronts emerge in the influenza cytokine storm [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39 (5): 541-550. DOI:10.1007/s00281-017-0636-y.

[21] Gu Y, Hsu AC, Pang Z, et al. Role of the innate cytokine storm induced by the influenza A virus [J]. *Viral Immunol*, 2019, 32(6):244-251. DOI:10.1089/vim.2019.0032.

[22] Liu Q, Zhou YH, Yang ZQ. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy [J]. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13 (1): 3-10. DOI: 10.1038/cmi.2015.74.

[23] Jia X, Liu B, Bao L, et al. Delayed oseltamivir plus sirolimus

treatment attenuates H1N1 virus-induced severe lung injury correlated with repressed NLRP3 inflammasome activation and inflammatory cell infiltration[J]. PLoS Pathog, 2018, 14 (11): e1007428. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007428.

[24] Kelly B, O' Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity[J]. Cell Res, 2015, 25(7): 771-784. DOI:10.1038/cr.2015.68.

[25] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11 (5): 325-337. DOI: 10.1038/nrc3038.

[26] Soto-Hereder o G, Gomez de Las Heras MM, Gabande-Rodriguez E, et al. Glycolysis-a key player in the inflammatory response [J]. FEBS J, 2020, 287 (16): 3350-3369. DOI:10.1111/febs.15327.

[27] Keshavarz M, Solaymani-Mohammadi F, Namdari H, et al. Metabolic host response and therapeutic approaches to influenza infection[J]. Cell Mol Biol Lett, 2020, 25: 15. DOI: 10.1186/s11658-020-00211-2.

[28] Ren L, Zhang W, Zhang J, et al. Influenza A virus (H1N1) infection induces glycolysis to facilitate viral replication[J]. Virol Sin, 2021, 36(6): 1532-1542. DOI:10.1007/s12250-021-00433-4.

[29] Fu XZ, Wang Y. Interferon-gamma regulates immunosuppression in septic mice by promoting the Warburg effect through the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Mol Med, 2023, 29(1): 95. DOI:10.1186/s10020-023-00690-x.

[30] Kim EY, Ner-Gaon H, Varon J, et al. Post-sepsis immunosuppression depends on NKT cell regulation of mTOR/IFN-γ in NK cells[J]. J Clin Invest, 2020, 130(6): 3238-3252. DOI:10.1172/JCI128075.

[31] Wang Z, Wei D, Bin E, et al. Enhanced glycolysis-mediated energy production in alveolar stem cells is required for alveolar regeneration[J]. Cell Stem Cell, 2023, 30(8): 1028-1042, e1027. DOI:10.1016/j.stem.2023.07.007.

(收稿日期:2024-01-02)

(本文编辑:王秋红)



中 华 医 学 会