

流感病毒 WSN 毒株通过 TGF- β 1/Smad3 介导的 STAT3 磷酸化调控类黏蛋白的表达

尤冬雪^{1,2,3}, 潘宸^{1,2}, 陈玉章^{1,2}, 周欣霓^{1,2}, 高铭^{1,3}, 陈梦颖^{1,3}, 王佳俊^{1,3}, 池晓娟^{1,2,3}, 王松^{1,2,3*}

- 1 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州
- 2 福建省畜禽病原感染与免疫学重点实验室, 福建 福州
- 3 闽台动物病原生物学福建省高校重点实验室, 福建 福州

尤冬雪, 潘宸, 陈玉章, 周欣霓, 高铭, 陈梦颖, 王佳俊, 池晓娟, 王松. 流感病毒 WSN 毒株通过 TGF- β 1/Smad3 介导的 STAT3 磷酸化调控类黏蛋白的表达[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 771-780.

YOU Dongxue, PAN Chen, CHEN Yuzhang, ZHOU Xinni, GAO Ming, CHEN Mengying, WANG Jiajun, CHI Xiaojuan, WANG Song. Influenza A/WSN/33 virus regulates the expression of orosomucoid through STAT3 phosphorylation mediated by TGF- β 1/Smad3 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(2): 771-780.

摘要: 【目的】探究 TGF- β 1/Smad3 在流感病毒 WSN 毒株感染过程中对类黏蛋白(orosomucoid, ORM)表达的调控作用。【方法】利用流感病毒 WSN 毒株感染或 TGF- β 1 处理 A549 细胞, 然后使用 Smad3 抑制剂处理, 通过 RT-PCR 检测 ORM 的表达情况; 构建过表达 STAT3 的细胞系与敲低 STAT3 的细胞系, 通过 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测 STAT3 在流感病毒诱导 ORM 表达中的作用; 使用 TGF- β 1 处理 A549 细胞, 通过 Western blotting 方法检测 p-STAT3 表达情况; 使用 TGF- β 1 或流感病毒处理 A549 细胞, 然后使用 Smad3 抑制剂处理, 检测 p-STAT3 表达情况; 构建 Smad3 表达敲低细胞系, 通过 Western blotting 方法检测 STAT3 磷酸化水平。【结果】TGF- β 1 调控 ORM1 和 ORM2 的表达依赖于 Smad3 的活化; STAT3 在流感病毒感染过程中参与了 ORM1 和 ORM2 的表达调控; TGF- β 1 能够诱导 STAT3 发生磷酸化; 阻断 Smad3 的活化或敲低 Smad3 表达后, TGF- β 1 或 WSN 诱导的 STAT3 的磷酸化也被抑制。【结论】流感病毒 WSN 毒株调控 ORM1 和 ORM2 的表达依赖于 TGF- β 1/Smad3 介导的 STAT3 磷酸化。

关键词: 流感病毒; TGF- β 1/Smad3; STAT3; 类黏蛋白

资助项目: 福建省自然科学基金(2020J06016); 福建农林大学科技创新专项基金(KFb22063XA)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J06016) and the Science and Technology Innovation Project of Fujian Agriculture and Forestry University (KFb22063XA).

*Corresponding author. E-mail: wscookie@163.com

Received: 2024-09-05; Accepted: 2024-12-03; Published online: 2024-12-25

Influenza A/WSN/33 virus regulates the expression of orosomuroid through STAT3 phosphorylation mediated by TGF- β 1/Smad3

YOU Dongxue^{1,2,3}, PAN Chen^{1,2}, CHEN Yuzhang^{1,2}, ZHOU Xinni^{1,2}, GAO Ming^{1,3}, CHEN Mengying^{1,3}, WANG Jiajun^{1,3}, CHI Xiaojuan^{1,2,3}, WANG Song^{1,2,3*}

1 College of Animal Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian, China

2 Key Laboratory of Animal Pathogen Infection and Immunology of Fujian Province, Fuzhou, Fujian, China

3 Key Laboratory of Fujian-Taiwan Animal Pathogen Biology, Fuzhou, Fujian, China

Abstract: [Objective] To investigate the regulatory effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1)/Smad3 on orosomuroid (ORM) expression during infection with influenza A/WSN/33 virus (hereinafter referred to as WSN). [Methods] A549 cells were either infected with WSN or treated with TGF- β 1, followed by treatment with Smad3 inhibitors. The mRNA levels of ORMs were assessed by RT-PCR. Subsequently, cell lines with signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) overexpression and knockdown were established, and RT-PCR and Western blotting were employed to evaluate the impact of STAT3 on ORM expression induced by the influenza virus. Furthermore, A549 cells underwent treatment with TGF- β 1, after which the phosphorylation status of STAT3 was analyzed via Western blotting. Finally, the phosphorylation level of STAT3 was detected after inhibiting the activity of Smad3 or knocking down the expression of Smad3 in A549 cells infected with WSN or treated with TGF- β 1. [Results] TGF- β 1 regulated the expression of ORM1 and ORM2 through the activation of Smad3, a key mediator in the TGF- β signaling pathway. Concurrently, STAT3 was implicated in modulating ORM1 and ORM2 expression during WSN infection. Additionally, TGF- β 1 was shown to induce STAT3 phosphorylation. Notably, inhibiting Smad3 activation or knocking down Smad3 expression suppressed STAT3 phosphorylation. [Conclusion] The regulation of ORM1 and ORM2 expression by WSN relied on STAT3 phosphorylation mediated by TGF- β 1/Smad3.

Keywords: influenza virus; TGF- β 1/Smad3; signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); orosomuroid

甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)是正黏病毒科的一种分节段负链 RNA 病毒,其宿主范围广泛,可以感染人类和多种动物,引起急性呼吸道感染,主要通过飞沫传播,部分也可经直接或间接接触传播。由于 IAV 具有极强的传染性和快速传播的特性,它能够在较短时间内引发局部乃至全球范围的流行病,造成严重的

公共卫生危机^[1]。当宿主被 IAV 感染后,其免疫系统会被迅速激活,进而触发一系列免疫调节因子的生成,包括趋化因子、促炎细胞因子以及其他关键的免疫调节细胞因子^[2]。

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是 TGF- β 超家族中的典型代表,在哺乳动物中主要存在 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3

三种异构体, 在胚胎发育、炎症、组织稳态和肿瘤发生等过程中发挥着关键作用^[3-4]。Smad3 是 Smad 家族的成员, 是 TGF- β 信号传导的主要转录因子。TGF- β 与其受体结合后活化下游的 Smad2 和 Smad3 蛋白, 并与 Smad4 结合形成异源三聚体, 在细胞核内聚集并调节靶基因的转录^[5], 在创伤修复、肿瘤发生和胚胎发育中发挥重要作用^[6]。

类黏蛋白(orosomuroid, ORM)是一类分泌蛋白, 属于急性期反应物, 主要由肝脏产生, 也在肺、脾和淋巴中表达^[7]。在人体内, ORM 蛋白主要有 ORM1 和 ORM2 两种亚型, 在小鼠中则存在 ORM1、ORM2 和 ORM3 三种亚型^[8]。ORM 蛋白具有多种生物学功能, 如药物运输、免疫调节、维持毛细血管屏障、脂质代谢的调控等^[9]。我们之前的研究发现^[10], IAV 感染激活 TGF- β 1, 进而调控 ORM1 和 ORM2 的表达, 但其中的调控机制尚不明确。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒与质粒

人肺腺癌细胞(A549)和人肾上皮细胞(HEK293T)均由本实验室保存。A/WSN/33(H1N1)(简称为WSN)由本实验室保存。PNL-STAT3、sh-STAT3 由潘宸构建, sh-Smad3 质粒由尤冬雪构建, 其余质粒均由本实验室保存。

1.2 主要试剂

高糖 DMEM 培养基与胎牛血清均购自 Gibco 公司; Lip8000 真核转染试剂和 TGF- β 受体抑制剂 SB431542 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; HRP 标记山羊抗兔/鼠 IgG 购自 Merck 公司; *Taq* DNA 酶和 T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; 高保真 DNA 聚合酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶购自赛默飞世尔科技(中国)有限公

司; PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术股份有限公司; 重组人 TGF- β 1 购自 PeproTech 公司; Smad3 特异性抑制剂 SIS3 购自奥默生物技术(上海)有限公司。

1.3 病毒感染

将细胞接种至 6 孔培养板, 待细胞密度达到 90% 左右时, 用 1 \times PBS 清洗 2 次, 加入 1 mL 含有 2 μ g/mL 胰酶的高糖 DMEM 病毒维持液, 并向其中添加病毒液, 使感染复数(multiplicity of infection, MOI)达到 1。将细胞置于培养箱中吸附 1 h, 每隔 15 min 摇晃 1 次。吸附完成后, 用 1 \times PBS 清洗 2 次, 然后每孔补充 2 mL 病毒维持液, 继续置于培养箱中培养。

1.4 细胞转染

将 HEK293T 细胞接种于 6 孔板, 待其生长至大约 70% 的密度时, 用 PBS 清洗 2 次, 每孔加入 900 μ L 含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 置于培养箱中以备后续转染操作。准备洁净的 1.5 mL 离心管, 加入 100 μ L 高糖 DMEM 培养基, 随后依次加入 3 μ g 目的质粒与 4 μ L Lip8000 转染试剂于离心管中, 混匀后静置 10 min, 将混合物均匀滴加至 6 孔板细胞上, 置于培养箱中继续培养。

1.5 RNA 提取及逆转录

收集细胞样品, 加入 1 mL 的 TRIzol, 随后加入适量氯仿, 充分混匀后于 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 12 min, 分离出水相。将水相转移至新管中, 加入等体积异丙醇, 混匀后在 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 保留沉淀。用 75% 的乙醇清洗 RNA 沉淀 2 次, 风干后溶解于适量的 DEPC 水中。最后, 利用微量分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度。

参照南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)说明书进行逆转录。

1.6 RT-PCR

RT-PCR 扩增体系与反应程序参照南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 2×*Taq* Plus Master Mix II (Dye Plus)说明书, 引物序列见表 1。

1.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

以逆转录获得的 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。qRT-PCR 反应体系(15 μL): 2×PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix 7.5 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, cDNA 0.8 μL, ddH₂O 5.7 μL。qRT-PCR 反应条件参照北京全式金生物技术股份有限公司 PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix 说明书。

1.8 过表达 STAT3 细胞株的构建

利用 RT-PCR 技术从 A549 细胞中扩增 STAT3 基因的全长序列, 所用引物序列为 PNL-STAT3-F (5'-CGGCTAGCATGGCCCAATGGAA TCAGCT-3')和 PNL-STAT3-R (5'-CCCTCGAGT TATCACATGGGGGAGGTAGCGC-3')。PCR 扩增体系(50 μL): 2×Phanta Flash Master Mix (Dye Plus) 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 20 μL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 12 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 1 min。将目标基因片段连接至 PNL-EGFP-CMV-WPREDU3 慢病毒表达载体, 构建重组质粒。测序验证成功后, 筛选出正确的 PNL-STAT3 重组质粒。随后将重组质粒与包装质粒

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'→3')
β-actin-F	TGGGTGTGAACCATGAGAAGT
β-actin-R	AAGGCCATGCCAGTGAGCTT
ORM 1-F	AGAGAGTACCAGACCCGACA
ORM 1-R	TCGTTACGTCAAAAGCAAGC
ORM 2-F	CCAACAAGACAGAGGACACG
ORM 2-R	CATCGTCCAGGTAGGAACCAAA

转染至 HEK293T 细胞中, 培养 48 h 后收集转染上清液, 加入适量 A549 细胞, 并以 1:1 000 的比例避光加入 Polybrene。混匀后加入 6 孔板, 随后放入水平离心机离心。32 °C、2 100 r/min 离心 120 min 后, 每孔补加 1 mL 含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基, 置于细胞培养箱中培养。

1.9 干扰 STAT3、Smad3 细胞株的构建

首先利用在线工具 (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>)设计针对 STAT3 和 Smad3 的短发夹 RNA (shRNA) 序列, 即 sh-STAT3 (5'-GCAACAGATTGCCTGCATTGG-3') 和 sh-Smad3 (5'-GGATTGAGCTGCACCTGAATG-3')。合成 shRNA 序列后, 通过退火处理形成双链 RNA 结构。接下来, 将退火后的 shRNA 产物与 pSIH-H1-GFP 慢病毒表达载体进行连接, 构建重组慢病毒表达质粒。最后参照过表达细胞株构建方法进行慢病毒的包装和感染。

1.10 Western blotting 检测

收集细胞样品, 加入适量蛋白裂解液(并添加蛋白酶抑制剂以防止蛋白降解)。冰浴裂解 30 min, 每 10 min 涡旋振荡 1 次以充分裂解, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 后, 收集上清, 加入等量 2×蛋白上样缓冲液, 置于沸水中煮 5 min。使用 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离, 在冰浴环境下以恒流 250 mA 转膜 120 min。转膜完成后, 用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h, 以阻断非特异性结合。接着, 将条带与特异性一抗在 4 °C 条件下孵育过夜。次日用含 0.1% Tween-20 的 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。随后, 室温孵育二抗 1 h, 再次用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。最后进行化学发光检测并记录结果。

1.11 统计学分析

本研究的所有结果均经过 3 次独立试验

证, 所得数据通过 *t* 检验进行显著性分析。统计分析标准如下: $P > 0.05$ 代表无差异(ns), $P < 0.05$ 代表有差异(*), $P < 0.01$ 代表差异显著(**), $P < 0.001$ 代表差异极显著(***)。

2 结果与分析

2.1 抑制 Smad3 的激活下调 ORM1 和 ORM2 的表达

前期研究结果证明, IAV 感染激活的 TGF- β 上调 ORM1 和 ORM2 的表达, 使用 TGF- β 受体抑制剂处理可以阻断 IAV 和 TGF- β 诱导的 ORM1 和 ORM2 表达水平升高^[10]。Smad3 是 TGF- β 的下游效应转录因子, 为了探究 Smad3 是否参与 ORM 的表达调控, 使用 TGF- β 1 刺激或者流感病毒 WSN 感染 A549 细胞, 然后加入 Smad3 的抑制剂 SIS3 处理细胞。RT-PCR 结果表明, 与对照组相比, SIS3 处理明显降低了 TGF- β 刺激或 WSN 感染诱导的 ORM1 和 ORM2 表达水平(图 1A、1B)。这一结果说明, SIS3 阻断 Smad3 的磷酸化抑制了 ORM1 和 ORM2 的表达, 证明 TGF- β 1 调控 ORM 的表达依赖于 Smad3 的活化。

2.2 过表达 STAT3 促进流感病毒诱导的 ORM1 和 ORM2 表达

之前研究结果表明, IL-6 也能够促进 ORM1 的少量表达^[10]。为了探究 IL-6 信号通路下游效应转录因子 STAT3 是否在 ORM 的表达调控中发挥作用, 首先构建了稳定过表达 STAT3 的 A549 细胞系(图 2A), 然后使用 WSN 分别感染 STAT3 过表达细胞系以及对照细胞系。RT-PCR 和 qRT-PCR 结果显示, STAT3 过表达细胞系中 ORM1 和 ORM2 的表达量与对照细胞系相比显著升高, 证明 STAT3 能够促进 ORM1 和 ORM2 的表达(图 2A-2C)。

2.3 敲低 STAT3 抑制流感病毒诱导的 ORM1 和 ORM2 表达

为了进一步验证 STAT3 对 ORM1 和 ORM2 表达的调控作用, 构建了敲低 STAT3 表达的 A549 细胞系(图 3A), 然后使用 WSN 分别感染 STAT3 表达敲低细胞系以及对照细胞系。RT-PCR 和 qRT-PCR 结果显示, 细胞中敲低 STAT3 的表达后, 流感病毒感染诱导的 ORM1 和 ORM2 表达量显著下降(图 3A-3C)。以上结果证明 STAT3 在 IAV 感染过程中参与了 ORM1

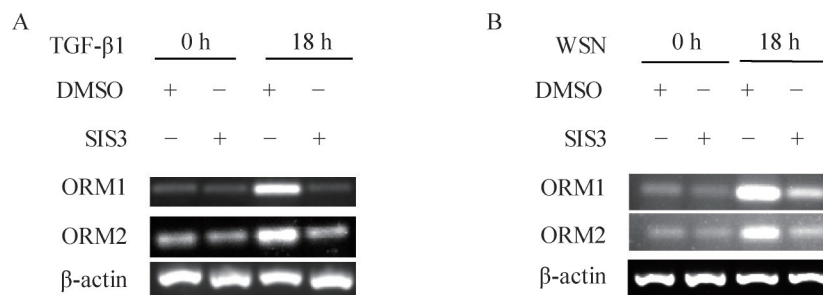


图1 抑制Smad3的激活下调ORM1和ORM2的表达。A: 使用SIS3 (10 μ mol/L)或DMSO处理TGF- β 1 (5 ng/mL)刺激的A549细胞, 18 h后检测ORM1和ORM2的表达水平; B: 使用SIS3 (10 μ mol/L)或DMSO处理流感病毒WSN (MOI=1)感染的A549细胞, 18 h后检测ORM1和ORM2的表达水平。

Figure 1 Inhibition of Smad3 activation down-regulates the expression of ORM1 and ORM2. A: TGF- β 1 (5 ng/mL) stimulated A549 cells were treated with SIS3 (10 μ mol/L) or DMSO, and the expression levels of ORM1 and ORM2 were detected after 18 h; B: Influenza virus WSN (MOI=1) infected A549 cells were treated with SIS3 (10 μ mol/L) or DMSO, and the expression levels of ORM1 and ORM2 were detected after 18 h.

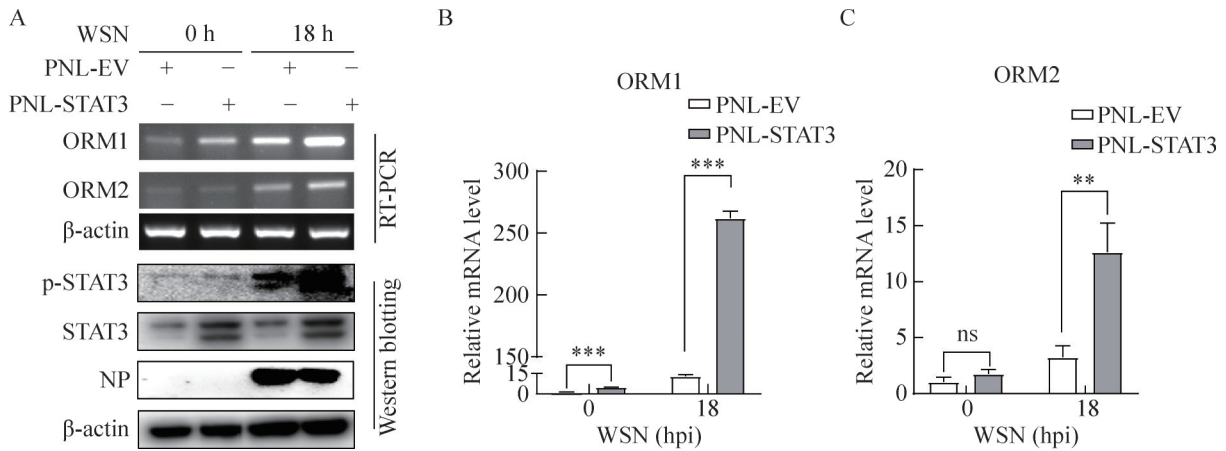


图2 过表达STAT3促进流感病毒诱导的ORM1和ORM2表达。A–C: WSN感染STAT3过表达细胞系后检测ORM1和ORM2的表达水平。**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$, 代表无差异。

Figure 2 Overexpression of STAT3 promoted the expression of ORM1 and ORM2 induced by influenza virus. A–C: The expression levels of ORM1 and ORM2 were detected in STAT3-overexpressing cell lines and control cell lines infected with WSN influenza virus. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$, indicates no statistical difference.

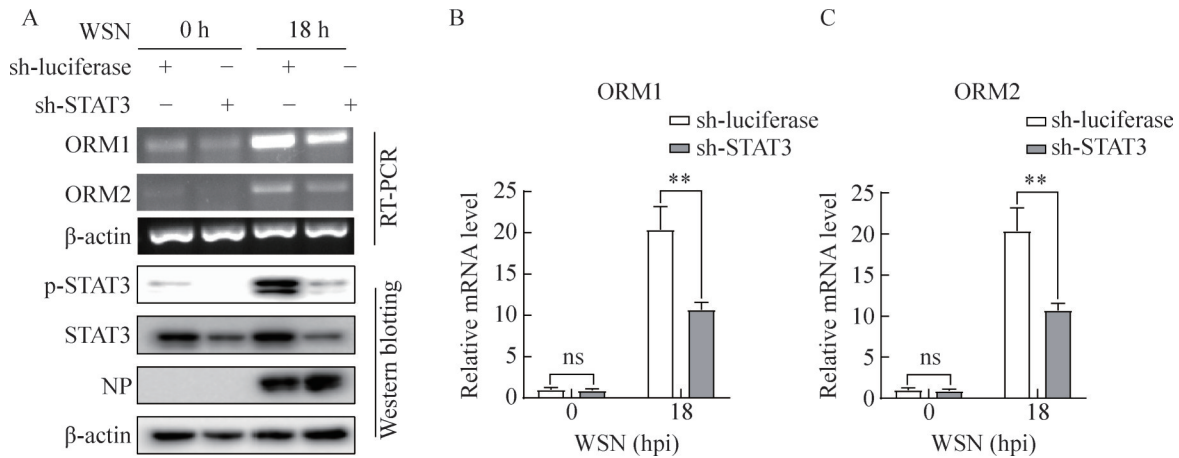


图3 敲低STAT3抑制流感病毒诱导的ORM1和ORM2表达。A–C: WSN感染STAT3敲低细胞系后检测ORM1和ORM2的表达水平。**: $P < 0.01$; ns: $P > 0.05$, 无统计学差异。

Figure 3 Knockdown of STAT3 inhibits influenza virus-induced ORM1 and ORM2 expression. A–C: The expression levels of ORM1 and ORM2 were detected in STAT3-knockdown cell lines and control cell lines infected with WSN influenza virus. **: $P < 0.01$; ns: $P > 0.05$, indicates no statistical difference.

和 ORM2 的表达调控。

2.4 TGF-β1 促进 STAT3 的磷酸化

由以上结果得知, STAT3 能够调控 ORM1 和 ORM2 的表达, 而 IL-6 处理仅能诱导 ORM1 的少量表达, 说明除了 IL-6, STAT3 可能还被

其他细胞因子激活。由于 TGF-β1 能够诱导 ORM1 和 ORM2 的表达, 接下来检测了 TGF-β1 是否可以激活 STAT3。使用 TGF-β1 处理 A549 细胞后, Western blotting 检测结果发现 TGF-β1 处理细胞 12 h 和 18 h 后, STAT3 磷酸化水平明

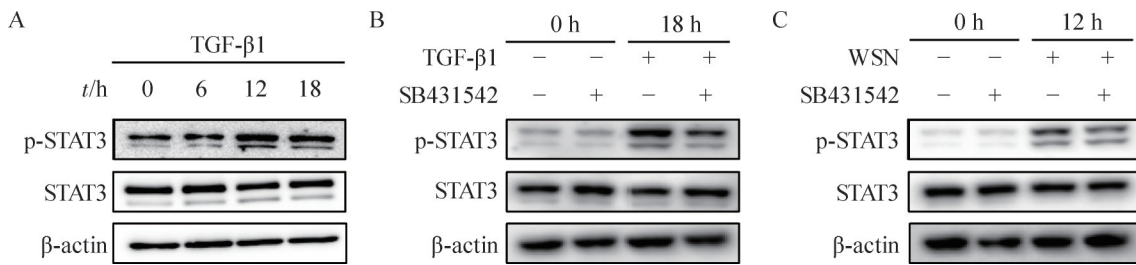


图4 TGF-β1促进STAT3磷酸化。 A: 使用TGF-β1 (5 ng/mL)处理A549 细胞后检测STAT3的磷酸化水平; B: 使用SB431542 (10 μmol/L)或DMSO处理TGF-β1 (5 ng/mL)刺激的A549细胞, 18 h后检测STAT3的磷酸化水平; C: 使用SB431542 (10 μmol/L)或DMSO处理WSN (MOI=1)感染的A549细胞, 12 h后检测STAT3的磷酸化水平。

Figure 4 TGF-β1 promotes the phosphorylation of STAT3. A: The phosphorylation level of STAT3 was detected in A549 cells treated with TGF-β1 (5 ng/mL); B: A549 cells were stimulated with TGF-β1 (5 ng/mL) followed by treatment with SB431542 (10 μmol/L), and the phosphorylation level of STAT3 was detected after 18 hours; C: A549 cells were infected with WSN influenza virus (MOI=1) followed by treatment with SB431542 (10 μmol/L) or DMSO, and the phosphorylation level of STAT3 was detected after 12 hours.

显升高(图 4A)。为了进一步验证 TGF-β1 能够调控 STAT3 的磷酸化水平, 在 TGF-β1 刺激或 WSN 感染细胞后, 使用 TGF-β1 受体特异性抑制剂 SB431542 处理并检测 STAT3 的磷酸化水平。Western blotting 结果显示, 在 TGF-β1 刺激或者 WSN 感染 A549 细胞后, SB431542 处理组中的 p-STAT3 水平与对照组相比明显下降, 说明阻断 TGF-β1 信号的传递后 STAT3 的磷酸化也被抑制(图 4B、4C)。以上实验结果证明 TGF-β1 能够通过其受体诱导 STAT3 发生磷酸化。

2.5 阻断 Smad3 的激活可以抑制 STAT3 的磷酸化

上述实验结果说明 TGF-β1 可以同时激活 Smad3 和 STAT3, 为了探究 Smad3 和 STAT3 之间是否存在调控关系, 使用 TGF-β1 刺激或者流感病毒 WSN 感染 A549 细胞, 然后加入 Smad3 的抑制剂 SIS3 处理细胞。Western blotting 结果显示, 在 TGF-β1 刺激或 WSN 感染后, SIS3 处理组的 STAT3 磷酸化水平与对照组相比均明显降低(图 5A、5B)。以上结果表明, 阻断 Smad3 的活化后, TGF-β1 或 WSN 诱导的 STAT3 的磷

酸化也被抑制。

2.6 敲低 Smad3 抑制 STAT3 的表达和磷酸化

为了进一步证明 Smad3 可以调控 STAT3 的磷酸化, 构建了敲低 Smad3 的 A549 细胞系(图 6A), 然后使用 WSN 分别感染 Smad3 敲低细胞系以及对照细胞系。Western blotting 结果显示, Smad3 敲低细胞系中 STAT3 的表达量和磷酸化水平与对照细胞系相比明显降低(图 6B)。以上结果证明, 敲低 A549 细胞中 Smad3 可以抑制 STAT3 的蛋白表达和磷酸化水平。

3 讨论与结论

流感病毒是一种具有高度传染性的病原微生物, 主要通过呼吸道途径在宿主体内引发感染, 它不仅能感染人类, 还能感染多种动物, 导致人畜共患病。类黏蛋白 ORM 作为急性期反应蛋白, 能够调节机体免疫应答^[9]。潘宸等研究中同样发现 IAV 感染激活 TGF-β, 进而增强 ORM1 和 ORM2 的表达, 其中 ORM2 可以抑制趋化因子 CCL3 的表达, 调控宿主体内的炎症反

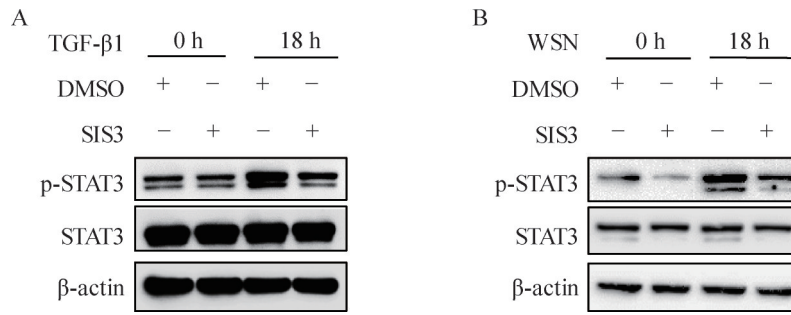


图5 阻断Smad3的激活可以抑制STAT3的磷酸化。A: 使用SIS3 (10 $\mu\text{mol/L}$)或DMSO处理TGF- β 1 (5 ng/mL)刺激的A549细胞, 18 h后检测STAT3的磷酸化水平; B: 使用SIS3 (10 $\mu\text{mol/L}$)或DMSO处理WSN (MOI=1)感染的A549细胞, 18 h后检测STAT3的磷酸化水平。

Figure 5 Blocking the activation of Smad3 inhibits the phosphorylation of STAT3. A: A549 cells were stimulated with TGF- β 1 (5 ng/mL) followed by treatment with SIS3 (10 $\mu\text{mol/L}$), and the phosphorylation level of STAT3 was detected after 18 hours; B: A549 cells were infected with WSN influenza virus (MOI=1) followed by treatment with SIS3 (10 $\mu\text{mol/L}$), and the phosphorylation level of STAT3 was detected after 18 hours.

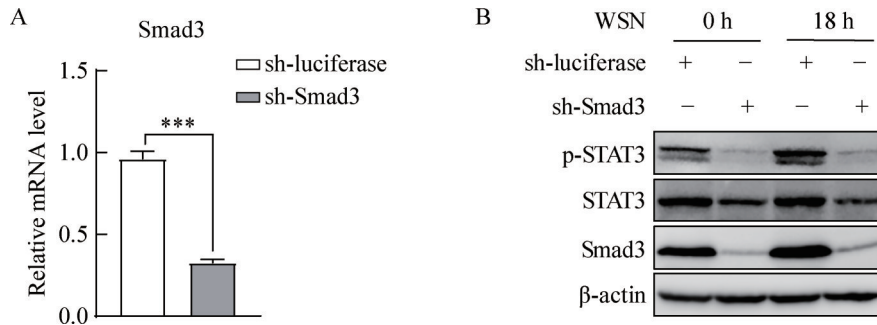


图6 敲低Smad3抑制STAT3的表达和磷酸化。A: 构建Smad3敲低细胞系和对照细胞系, 通过qRT-PCR检测Smad3的敲低效果(***: $P < 0.001$); B: 使用WSN (MOI=1)感染Smad3敲低细胞系, 18 h后检测STAT3的蛋白表达和磷酸化水平。

Figure 6 Knockdown of Smad3 inhibits the expression and phosphorylation level of STAT3. A: The Smad3 knockdown and control cell lines were generated and the knockdown effect of Smad3 was detected by qRT-PCR (***: $P < 0.001$); B: The Smad3 knockdown and control cell lines were infected with WSN (MOI=1), and the protein expression and phosphorylation level of STAT3 were detected 18 hours later.

应^[10]。因此, ORM蛋白在IAV感染中的表达调控对于调节炎症反应以及防止细胞因子风暴等方面发挥着重要作用, 这些功能对于宿主的防御机制和疾病进程的控制至关重要。Smad3作为TGF- β 经典信号通路的下游蛋白, 在TGF- β 信号转导中起到了重要的作用。使用Smad3的抑制剂SIS3处理A549细胞, 然后感染甲型流

感病毒WSN或使用TGF- β 1刺激, ORM1和ORM2的表达受到明显抑制, 说明TGF- β 1通过激活Smad3调控ORM1和ORM2的表达。

STAT3是信号分子STAT家族的成员, 是一种重要的转录因子, 对病原所引发的炎症刺激作出反应, 调节基因表达^[11]。它参与多种生物过程, 包括伤口愈合、血管生成、炎症反应和

癌症等^[12]。流感病毒感染时上调 IL-6 表达激活 STAT3 磷酸化, 而激活后的 STAT3 又可以负反馈调节 IL-6 的表达^[13]。本研究使用 TGF- β 1 刺激 A549 细胞, 发现不仅可以激活 Smad3, 还可以促进 STAT3 的磷酸化, 这与 Dees 等^[14]在成纤维细胞中发现的结果一致。我们深入探究了 STAT3 对 ORM1 和 ORM2 的影响, 发现流感病毒感染 STAT3 过表达细胞系后, ORM1 和 ORM2 表达水平均显著上升, 而感染 STAT3 表达敲低细胞系后, ORM1 和 ORM2 表达水平显著下降, 说明 STAT3 在流感病毒诱导 ORM1 和 ORM2 的表达过程中发挥了重要作用。

TGF- β 1 既可以通过激活 STAT3 调控 ORM1 和 ORM2 的表达, 又可以活化其下游 Smad3 分子, 进而促进 ORM1 和 ORM2 的表达。进一步研究发现, 敲低 Smad3 表达或者使用 Smad3 抑制剂 SIS3 处理 A549 细胞, 然后感染甲型流感病毒 WSN 或使用 TGF- β 1 刺激, 发现 STAT3 的磷酸化水平与对照组相比受到明显抑制, 说明 STAT3 活化受到 TGF- β 1/Smad3 的调控。此外, TGF- β 1 还可以通过不依赖于 Smad 的方式激活 JAK1-STAT3 信号通路, Tang 等^[15]发现 TGF- β 1 可以通过其受体 TGF β R1 与 JAK1 结合使 JAK1 被活化, 进而磷酸化 STAT3, 并与 SMAD 通路协同诱导肝纤维化。

TGF- β 信号通路不仅与 STAT3 信号通路存在调控关系, 还与其他形式信号转导通路相互作用, 包括 Notch、Hippo 和 Wnt 通路^[16]。除了依赖于经典的 Smad 信号通路, TGF- β 也可以通过非经典通路进行信号转导, 如激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)^[17]和磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)通路^[18]。综上所述, 甲型流感病毒可以通过 TGF- β 1/Smad3 介导的 STAT3 磷酸化调控 ORM1 和 ORM2 的表达, 但或许这不是

TGF- β 1/Smad3 信号通路的唯一作用方式, TGF- β 1/Smad3 还可能通过其他信号分子并协同 STAT3 调控 ORM1 和 ORM2 的表达, 这需要我们进一步深入研究。本研究探讨了 ORM 在 IAV 感染中的关键作用, 为揭示流感病毒的致病机制提供了重要科学依据。此外, 本研究不仅为 IAV 的临床诊断提供了新的思路, 还为研发新型抗流感病毒药物指明了潜在的研究方向, 具有显著的科学价值和实际应用意义。

作者贡献声明

尤冬雪: 实验操作、数据处理与分析、论文撰写与修改; 潘宸: 实验操作、数据收集和处理; 陈玉章: 论文讨论、协助实验操作; 周欣霓: 协助实验操作、数据处理; 高铭: 协助实验操作; 陈梦颖: 协助实验操作; 王佳俊: 协助实验操作; 池晓娟: 论文讨论、技术支持; 王松: 研究构思和设计、论文撰写和修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] HUSSAIN M, GALVIN HD, HAW TY, NUTSFORD AN, HUSAIN M. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2017, 10: 121-134.
- [2] GRAHAM AC, HILMER KM, ZICKOVICH JM, OBAR JJ. Inflammatory response of mast cells during influenza A virus infection is mediated by active infection and RIG-I signaling[J]. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.)*, 2013, 190(9): 4676-4684.
- [3] MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- β and the TGF- β family: context-dependent roles in cell and tissue physiology[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(5): a021873.
- [4] COLAK S, TEN DIJKE P. Targeting TGF- β signaling in cancer[J]. *Trends in Cancer*, 2017, 3(1): 56-71.
- [5] HUANG CS, HU FQ, SONG D, SUN XL, LIU AY, WU Q, SHE XW, CHEN YQ, CHEN LS, HU FY, XU F, LUO XL, FENG YD, YANG XP, HU JB, WANG GH. EZH2-triggered methylation of SMAD3 promotes its activation

- and tumor metastasis[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2022, 132(5): e152394.
- [6] OOSHIMA A, PARK J, KIM SJ. Phosphorylation status at Smad3 linker region modulates transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition and cancer progression[J]. *Cancer Science*, 2019, 110(2): 481-488.
- [7] LUO ZM, LEI H, SUN Y, LIU X, SU DF. Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities[J]. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2015, 71(2): 329-340.
- [8] 徐栋平. 急性期蛋白 ORM 在缺血性脑卒中的保护作用及其机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学硕士学位论文, 2018.
- XU DP. The protective effect and mechanism of acute phase protein ORM on ischemic stroke[D]. Shanghai: Master's Thesis of Naval Medical University, 2018 (in Chinese).
- [9] WAN JJ, WANG PY, ZHANG Y, QIN Z, SUN Y, HU BH, SU DF, XU DP, LIU X. Role of acute-phase protein ORM in a mice model of ischemic stroke[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(11): 20533-20545.
- [10] 潘宸, 胡精蕴, 张岩威, 赵森红, 张欣格, 彭本群, 毛亚楠, 王淑霖, 王松. 甲型流感病毒通过调控 TGF- β 1 介导的 ORM2 抑制 CCL3 表达[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(10): 1308-1316.
- PAN C, HU JY, ZHANG YW, ZHAO SH, ZHANG XG, PENG BQ, MAO YN, WANG SL, WANG S. Influenza A virus inhibits CCL3 expression by regulating TGF- β 1-mediated ORM2[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2022, 52(10): 1308-1316 (in Chinese).
- [11] HILLMER EJ, ZHANG H, LI HS, WATOWICH SS. STAT3 signaling in immunity[J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2016, 31: 1-15.
- [12] ZHONG Z, WEN Z, JR DARNELL JE. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6[J]. *Science*, 1994, 264(5155): 95-98.
- [13] LIU SS, YAN RX, CHEN B, PAN QD, CHEN YH, HONG JX, ZHANG LF, LIU WJ, WANG S, CHEN JL. Influenza virus-induced robust expression of SOCS3 contributes to excessive production of IL-6[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1843.
- [14] DEES C, PÖTTER S, ZHANG Y, BERGMANN C, ZHOU X, LUBER M, WOHLFAHRT T, KAROUZAKIS E, RAMMING A, GELSE K, YOSHIMURA A, JAENISCH R, DISTLER O, SCHEIT G, DISTLER JH. TGF- β -induced epigenetic deregulation of SOCS3 facilitates STAT3 signaling to promote fibrosis[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2020, 130(5): 2347-2363.
- [15] TANG LY, HELLER M, MENG ZJ, YU LR, TANG Y, ZHOU M, ZHANG YE. Transforming growth factor- β (TGF- β) directly activates the JAK1-STAT3 axis to induce hepatic fibrosis in coordination with the SMAD pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(10): 4302-4312.
- [16] LUO KX. Signaling cross talk between TGF- β /smad and other signaling pathways[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2017, 9(1): a022137.
- [17] HELDIN CH, MOUSTAKAS A. Signaling receptors for TGF- β family members[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(8): a022053.
- [18] DAVID CJ, MASSAGUÉ J. Contextual determinants of TGF- β action in development, immunity and cancer[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19(7): 419-435.