网络出版时间:2025-10-31 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.04.001

猪繁殖与呼吸综合征病毒激活mTORC1/HIF-1α通路诱导炎症的作用机制

李晓冰[1,2],段滇宁[1,2],黄敏[1],江潜城[1],杜以梦[1],
刘建奎[1,3],邱龙新[1,2],陈洪博[1,2]

(1 龙岩学院 生命科学学院,福建 龙岩 364012;2 预防兽医学与生物技术福建省高等学校重点实验室,福建 龙岩 364012;
3 动物源性人兽共患病防控福建省高校工程研究中心,福建 龙岩 364012)

[摘 要] 【目的】探究缺氧诱导因子1α(HIF-1α)在猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)诱导的猪肺泡巨噬细胞炎症中的作用机制。【方法】采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)和实时荧光定量PCR(Real-time PCR,RT-qPCR),检测感染PRRSV的猪肺脏、肺泡巨噬细胞HIF-1α mRNA和蛋白表达水平。使用BAY87-2243或$CoCl_2$处理PRRSV感染的猪肺泡巨噬细胞,检测PRRSV M蛋白和mRNA表达水平,ELISA检测白细胞介素1β(IL-1β)、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子α(TNF-α)的水平。将猪肺泡巨噬细胞转染TSC2 siRNA后,用mTORC1抑制剂Rapa和mTOR抑制剂KU0063794处理,用Western Blot检测猪肺泡巨噬细胞mTOR对HIF-1α的调控机制。将猪肺泡巨噬细胞过表达mTORC1后,检测PRRSV对HIF-1α和炎症因子水平的影响。【结果】PRRSV感染可明显提高猪肺脏、肺泡巨噬细胞HIF-1α mRNA和蛋白表达水平。与PRRSV组相比,HIF-1α激活组($CoCl_2$处理)促进了PRRSV M蛋白和mRNA的表达,IL-1β、IL-6和TNF-α的含量极显著升高($P<0.01$);HIF-1α抑制组(BAY87-2243处理)降低了PRRSV M蛋白和mRNA的表达,IL-1β、IL-6和TNF-α的含量显著或极显著降低($P<0.01$)。PRRSV促进肺泡巨噬细胞中mTOR表达,抑制mTOR后HIF-1α的表达降低,炎症细胞因子水平显著或极显著降低;重新恢复HIF-1α的表达后,炎症细胞因子水平显著升高($P<0.05$)。mTOR主要通过mTORC1上调HIF-1α表达;过表达mTORC1可提高PRRSV M和HIF-1α蛋白水平,促进炎症细胞因子表达($P<0.05$)。【结论】HIF-1α可调控PRRSV诱导的肺泡巨噬细胞炎症反应,其表达受mTORC1信号通路调节。

[关键词] 猪繁殖与呼吸综合征病毒;缺氧诱导因子1α;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;炎症因子;肺泡巨噬细胞
[中图分类号] S852.65+1 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)04-0001-09

Mechanism of inflammation induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus via mTORC1/HIF-1α signaling pathway activation

LI Xiaobing[1,2],DUAN Dianning[1,2],HUANG Min[1],JIANG Qiancheng[1],DU Yimeng[1],
LIU Jiankui[1,3],QIU Longxin[1,2],CHEN Hongbo[1,2]

(1 *College of Life Science,Longyan University,Longyan,Fujian* 364012,*China*;2 *Key Laboratory of Fujian Universities Preventive Veterinary Medicine and Biotechnology,Longyan,Fujian* 364012,*China*;3 *Engineering Research Center for the Prevention and Control of Animal Original Zoonosis,Longyan,Fujian* 364012,*China*)

[收稿日期] 2025-02-20 [修回日期] 2025-03-15
[基金项目] 国家自然科学基金项目(32102628);福建省自然科学基金项目(2022J011157);龙岩学院博士科研启动基金项目(LB2022009)
[作者简介] 李晓冰(1993—),男,福建漳州人,讲师,博士,主要从事病毒遗传进化多样性及致病性研究。E-mail:924464270@qq.com
[通信作者] 陈洪博(1986—),男,山东青州人,副教授,博士,主要从事PRRSV致病机制研究。E-mail:lyxy_vet@163.com

中国知网 https://www.cnki.net

Abstract:【Objective】The study aims to explore the mechanism of hypoxia-inducible factor HIF-1α in porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced inflammation in porcine alveolar macrophages.【Method】HIF-1α mRNA and protein expression levels in PRRSV-infected porcine lungs and alveolar macrophages were assessed using Western Blot and real-time quantitative PCR (RT-qPCR). PRRSV-infected porcine alveolar macrophages were treated with BAY87-2243 or $CoCl_2$, followed by detection of PRRSV M protein and mRNA expression, and ELISA quantification of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor alpha (TNF-α). TSC2 siRNA-transfected porcine alveolar macrophages were treated with Rapa (mTORC1 inhibitor) and KU0063794 (mTOR inhibitor), and the regulatory mechanism of mTOR on HIF-1α in porcine alveolar macrophages was detected by Western Blot. After mTORC1 overexpression in porcine alveolar macrophages, the effects of PRRSV on the levels of HIF-1α and inflammatory cytokines were evaluated.【Result】PRRSV infection significantly elevated HIF-1α mRNA and protein levels in porcine lungs and alveolar macrophages. Compared with the PRRSV-infected group, the HIF-1α activation group ($CoCl_2$ treatment) showed increased expression of PRRSV M protein and mRNA and significantly elevated levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α ($P<0.01$). The HIF-1α inhibition group (BAY87-2243 treatment) exhibited decreased expression of PRRSV M protein and mRNA and significantly reduced levels of IL-1β, IL-6, and TNF-α ($P<0.01$). PRRSV was found to enhance mTOR expression in alveolar macrophages, while mTOR inhibition decreased HIF-1α expression and significantly or extremely significantly reduced inflammatory cytokine levels. Upon re-elevating HIF-1α expression, the inflammatory cytokine levels significantly increased ($P<0.05$). mTOR mainly upregulated HIF-1α expression through mTORC1. Overexpression of mTORC1 leads to increased levels of PRRSV M protein and HIF-1α protein, enhancing inflammatory cytokine expression ($P<0.05$).【Conclusion】HIF-1α plays a pivotal role in regulating PRRSV-induced inflammatory responses of alveolar macrophages, with its expression modulated by the mTORC1 signaling pathway.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; hypoxia inducible factor 1α; mammalian target of rapamycin; inflammatory factors; alveolar macrophage

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是由PRRS病毒(PRRSV)引起猪的一种高度传染性疾病,主要造成母猪繁殖障碍和仔猪呼吸困难、死亡及免疫机能障碍,在世界范围内广泛流行,困扰全球养猪业的持续健康发展[1-2]。PRRSV主要感染猪肺泡巨噬细胞,感染后肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、白细胞介素-1β(interleukin 1β, IL-1β)、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、白介素6(IL-6)和白介素8(IL-8)等多种炎症因子大量表达,形成"炎症因子"风暴,使猪机体炎症调节失衡。"炎症因子"风暴是PRRSV导致猪死亡的重要因素之一,其可导致猪免疫系统以及肺、肾、心肌等器官损伤,体温升高,关节肿大,呼吸困难,应激反应[3-4]。炎症反应在PRRSV感染的致病机制中起重要作用,深入了解PRRSV的致病机制对开发有效的防控措施具有重要意义。PRRSV诱导炎症的研究已经取得了一些进展,如PRRSV可激活宿主细胞TLR4/MyD88、NF-κB、ERK1/2和p38MAPK等炎症信号通路,导致炎症因子的表达增加[5-7],但PRRSV诱导炎症的具体分子机制仍不完全清楚。

细胞代谢在免疫反应中起着核心作用,特别是糖酵解和氧化磷酸化等途径,为细胞功能提供了必要的能量和分子基础。当细胞受到病原体或损伤刺激时,其代谢途径会发生变化,促进炎症因子的合成和分泌。炎症反应导致组织代谢旺盛,耗氧增加,致使炎症组织部位细胞处于"生理性低氧"环境中。缺氧诱导因子1α(hypoxiainducible factor-1α, HIF-1α)对组织细胞适应低氧环境具有调节作用,其影响几乎涵盖了生理学的各方面,包括细胞能量代谢、胚胎发育和免疫应答等,同时HIF-1α在炎症反应方面也发挥着至关重要的调控作用[8-9]。研究表明,人免疫缺陷病毒(HIV)[10]、戊型肝炎病毒(HEV)[11]和呼吸道合胞病毒(RSV)[12]等感染可促进细胞内HIF-1α表达,影响细胞糖代谢过程以及炎症细胞因子的表达。巨噬细胞感染病原后即使在有氧环境下也会增强HIF-1α蛋白的表达和稳定性,

中国知网 https://www.cnki.net

HIF-1α基因表达增强依赖于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）信号的激活[13-14]。本课题组前期研究发现，猪原代肺泡巨噬细胞感染 PRRSV 可促进 HIF-1α 表达，敲低 HIF-1α 表达能降低 PRRSV 滴度，HIF-1α 在 PRRSV 感染、致病过程中起重要作用[15]，然而目前对 PRRSV 感染中 HIF-1α 与炎症因子的关系却仍不清楚。为此，本试验探究了 PRRSV 感染肺泡巨噬细胞中 HIF-1α 与 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 炎症细胞因子含量的关系，以及 mTORC1/HIF-1α 通路对炎症细胞因子表达的作用，旨在为 PRRSV 的防控和药物治疗提供新思路。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　细胞、病毒和肺脏组织　猪肺泡巨噬细胞系 3D4/21 细胞，购自湖南丰晖生物科技有限公司；mTORC1 过表达质粒 pcDNA-flag-mTORC1 和 PRRSV（GenBank：KP860909，病毒滴度为 $2\times10^{-5.79}$ $TCID_{50}$/mL），由预防兽医学与生物技术福建省高等学校重点实验室保存；PRRSV 未感染和感染仔猪肺脏组织，由本课题组刘建奎教授惠赠[16]。

1.1.2　主要试剂　胎牛血清（fetal bovine serum，FBS），购自 Biological Industries（BI）；Total RNA Extraction Reagent、HiScript Ⅲ RT SuperMix 和 SYBR Green Master Mix，购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；β-actin 鼠抗单克隆抗体（1∶1 000 倍稀释）、mTOR 鼠抗单克隆抗体（1∶1 000 倍稀释）和磷酸化 mTOR（p-mTOR）鼠抗单克隆抗体（1∶1 000 倍稀释），购自 Cell Signaling Technology 公司；HIF-1α 鼠抗单克隆抗体（1∶1 000 倍稀释），购自 Abcam 公司；PRRSV M 兔抗多克隆抗体（1∶1 000 倍稀释），购自北京博奥森生物技术有限公司；p-S6（S240/244）兔抗单克隆抗体（1∶1 000 倍稀释），购自武汉爱博泰克公司；TSC2 鼠抗单克隆抗体（1∶1 000 倍稀释），购自 proteintech 公司；Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent，购自 Invitrogen 公司；0.22 μm PVDF 膜，购自 Millipore 公司；$CoCl_2$，购自 Sigma 公司，用 DMEM 溶解，配制成浓度为 100 mmol/L 的母液，储存于－20 ℃冰箱备用；BAY87-2243、KU0063794 和雷帕霉素（rapamycin，Rapa），购自 MCE 公司，均用 DMSO 溶解，分别配制成浓度为 400，300 和 10 000 μmol/L 的母液，储存于－20 ℃冰箱备用；山羊抗兔 IgG-HRP（1∶5 000 倍稀释）、山羊抗鼠 IgG-HRP（1∶5 000 倍稀释）、SDS-PAGE 凝胶试剂盒和 ECL 化学发光检测试剂盒，购自碧云天生物科技有限公司；ELISA 检测试剂盒，购自上海酶联生物科技有限公司。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.2　试验方法

1.2.1　PRRSV 对猪肺脏和肺泡巨噬细胞 HIF-1α 水平的影响　培养 3D4/21 细胞，待其融合度达到 90% 时分成对照组（CK）和 PRRSV 组，PRRSV 组加入感染复数（MOI）为 1 的 PRRSV 病毒液，37 ℃孵育 2 h 后换成维持液，于 12，24 和 48 h 收集样品。提取 PRRSV 阴性和阳性猪肺脏和 3D4/21 细胞的蛋白，用 Western Blot 检测 HIF-1α 蛋白表达；用 TRIzol 方法提取 PRRSV 阴性和阳性猪肺脏和 3D4/21 细胞总 RNA，用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA，采用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）测 *HIF-1α* mRNA 表达水平。

1.2.2　HIF-1α 对 PRRSV 诱导炎症因子的作用　使用不同浓度 HIF-1α 抑制剂 BAY87-2243 或诱导细胞低氧环境的 $CoCl_2$ 处理感染 PRRSV 的 3D4/21 细胞，检测 HIF-1α 在 PRRSV 诱导炎症反应中的作用。将生长良好的 3D4/21 细胞在六孔板中传代培养，待其融合度达到 90% 时，分成对照组（CK）、PRRSV 组、PRRSV＋$CoCl_2$ 组和 PRRSV＋BAY87-2243 组，PRRSV、PRRSV＋$CoCl_2$ 和 PRRSV＋BAY87-2243 组细胞加入 MOI 为 1 的 PRRSV 病毒液，37 ℃孵育 2 h，然后 PRRSV＋$CoCl_2$ 组换成含 $CoCl_2$（浓度 50 和 100 μmol/L）的维持液培养，PRRSV＋BAY87-2243 组换成含 BAY87-2243（浓度 200 和 400 nmol/L）的维持液培养，对照组和 PRRSV 组换成等量的维持液培养，于 24，48 h 时收集样品。采用 Western Blot 检测 PRRSV M 蛋白表达水平，用 RT-qPCR 检测 200 nmol/L BAY87-2243 和 50 μmol/L $CoCl_2$ 处理 PRRSV *M* mRNA 表达水平，用 ELISA 试剂盒检测 200 nmol/L BAY87-2243 和 50 μmol/L $CoCl_2$ 处理细胞上清液中 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的含量。

1.2.3　mTOR 对 PRRSV 诱导炎症因子的作用　mTOR 通过调节细胞代谢和蛋白质合成，促进炎症反应的进行。将 PRRSV 感染 3D4/21 细胞后，使用 mTOR 抑制剂 Rapa 或细胞低氧环境诱导剂 $CoCl_2$ 进行处理，以检测 mTOR 在 PRRSV 诱导肺泡巨噬细胞炎症因子表达中的作用。培养 3D4/21 细

中国知网　https://www.cnki.net

胞,待其融合度达到90%时,分成对照组(CK)、PRRSV组、PRRSV+Rapa组(PRRSV+R)和PRRSV+Rapa+$CoCl_2$组(PRRSV+R+C),PRRSV接毒参考1.2.2节方法进行,PRRSV+R组换成含Rapa(10 μmol/L)维持液培养,PRRSV+R+C组换成含Rapa(10 μmol/L)和$CoCl_2$(50 μmol/L)维持液培养,对照组和PRRSV组换成等量的维持液培养,24 h时收集细胞和上清液,采用Western Blot检测细胞HIF-1α、p-mTOR和mTOR蛋白的变化,用ELISA试剂盒检测细胞上清液IL-1β、TNF-α和IL-6的含量。

1.2.4 mTOR对HIF-1α的调控作用 mTOR蛋白包括2种复合体mTORC1和mTORC2,mTORC1和mTORC2在组成和功能上有差异。结节性硬化症蛋白复合体2(tuberous sclerosis complex 2,TSC2)是mTOR的负调控因子,磷酸化S6(phospho-S6,p-S6)是mTORC1活化的标志。利用siRNA抑制3D4/21细胞TSC2表达,以检测mTOR对HIF-1α蛋白的调控作用。将3D4/21细胞转染TSC2 siRNA后分别用mTORC1的抑制剂Rapa和mTOR抑制剂KU0063794(KU)处理,以探究mTOR调控HIF-1α表达的形式。

根据猪源TSC2基因mRNA序列(XM_003354670.4)设计TSC2 siRNA si-TSC2(正义链:GCUGUUACCUUGACGAGUACA,反义链:UACUCGUCAAGGUAACAGCUG)。培养3D4/21细胞,待其融合度达到80%时,使用Lipofectamine 3000转染si-TSC2,转染操作如下:20 μmol/L siRNA 5 μL+Opti-MEM 125 μL,轻轻混匀;Lipofectamine 3000 5 μL+Opti-MEM 125 μL,轻轻混匀;将2管混匀,室温孵育15 min,加入到细胞中,转染24 h后分别加入Rapa(10 μmol/L)或KU0063794(300 nmol/L),Western Blot检测细胞HIF-1α和p-S6蛋白水平的变化。

1.2.5 mTORC1对PRRSV诱导炎症因子表达的作用 将mTORC1过表达质粒转染3D4/21细胞,以确定mTORC1在PRRSV调控HIF-1α表达中的作用。培养3D4/21细胞,待其融合度达80%时,分成对照组(CK)和试验组,试验组用Lipofectamine 3000转染mTORC1过表达质粒pcDNA-flag-mTORC1,转染操作如下:5 μL Lipofectamine 3000+250 μL Opti-MEM,轻轻混匀;2.5 μg质粒+250 μL Opti-MEM,加入5 μL P3000试剂,轻轻混匀;将2管混匀,室温孵育15 min,将转染复合物加入到细胞中,24 h后CK组和试验组均接种PRRSV(MOI=1),48 h后收集细胞及上清液,采用Western Blot检测细胞HIF-1α、p-S6和PRRSV M蛋白水平的变化,用ELISA试剂盒检测细胞上清液IL-1β、TNF-α和IL-6的含量。

1.2.6 *HIF-1α*和PRRSV *M* mRNA水平RT-qPCR检测 用TRIzol方法提取肺脏和3D4/21细胞总RNA,用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA。以*β-actin*为内参基因,采用RT-qPCR法检测*HIF-1α*和PRRSV *M*基因mRNA变化,反应体系为:cDNA(50 ng/μL)2 μL、SYBR Green 10 μL、上游引物(10 μmol/L)0.6 μL、下游引物(10 μmol/L)0.6 μL、双蒸馏水6.8 μL。采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算mRNA的相对表达量。试验所需引物序列见表1。

表1 扩增miRNA的引物

Table 1 Primers for miRNA amplification

引物 Primer	序列(5′→3′) Sequences (5′→3′)	产物长度/bp Product length
HIF-1α-F	GAACAGAATGGAACGGAGCAA	75
HIF-1α-R	TGATTGCCCCAGGAGTCTAC	
PRRSV-M -F	AAACCAGTCCAGAGGCAAGG	124
PRRSV-M-R	TCAGTCGCAAGAGGGAAATG	
β-actin-F	AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG	175
β-actin-R	TGCGGGACATCAAGGAGA	

1.2.7 样品中蛋白水平Western Blot检测 样品使用RIPA裂解液获得细胞蛋白样品,测定浓度后使用5×loading buffer煮沸变性,样品经SDS-PAGE电泳、转膜,4 ℃冰箱过夜孵育目的蛋白一抗(1∶1 000倍稀释),37 ℃恒温箱孵育HRP标记的二抗2 h(1∶5 000倍稀释),洗膜后曝光观察分析。试验选用β-actin或甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)蛋白为内参蛋白。

1.3 数据分析

试验数据用GraphPad Prism 5.0软件进行分

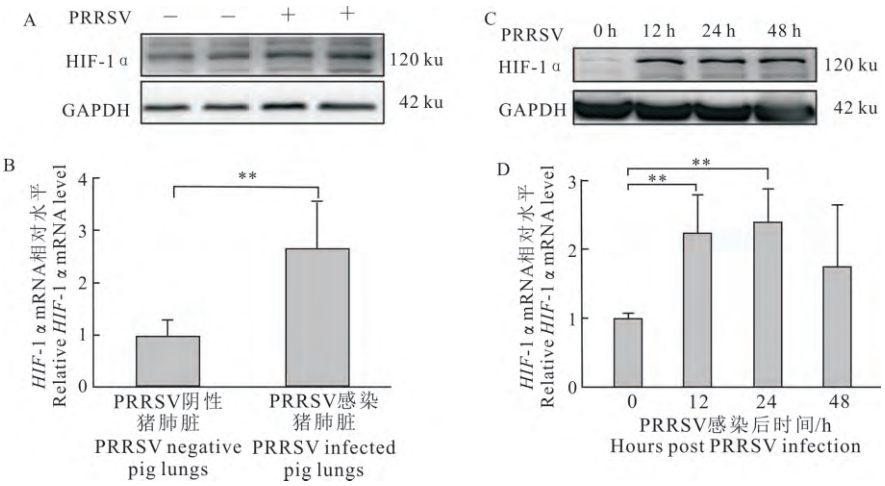
中国知网 https://www.cnki.net

析，组间差异性采用单因素方差法进行分析，结果以“平均值±标准差”表示。

2　结果与分析

2.1　PRRSV 对 HIF-1α 表达的影响

猪肺脏 HIF-1α 含量的结果如图 1-A、B 所示，与 CK 组相比，PRRSV 感染猪肺脏 HIF-1α 蛋白表达水平升高，*HIF*-1α mRNA 的表达量极显著升高（$P<0.01$）。检测 3D4/21 细胞感染 PRRSV 后 HIF-1α 含量的变化，Western Blot 结果显示，与 CK 组相比，感染 PRRSV 12，24 和 48 h 细胞内 HIF-1α 蛋白水平明显升高（图 1-C）；RT-qPCR 结果显示，与 CK 组相比，*HIF*-1α mRNA 水平在感染后 12 和 24 h 极显著升高（$P<0.01$），感染时间延长至 48 h 时 *HIF*-1α mRNA 水平高于 CK 组，但无显著差异（图 1-D）。试验结果表明，感染 PRRSV 后猪肺泡巨噬细胞和仔猪肺脏组织 *HIF*-1α mRNA 和蛋白水平均升高。



A. PRRSV 感染猪肺脏 HIF-1α 蛋白水平变化；B. PRRSV 感染猪肺脏 *HIF*-1α mRNA 水平变化；C. PRRSV 感染 3D4/21 细胞 HIF-1α 蛋白水平变化；D. PRRSV 感染 3D4/21 细胞 *HIF*-1α mRNA 水平变化。图柱上标*表示差异显著（$P<0.05$），标**表示差异极显著（$P<0.01$）。下图同。

A. HIF-1α protein levels in PRRSV-infected lungs; B. *HIF*-1α mRNA levels in PRRSV-infected lungs; C. HIF-1α protein levels in PRRSV-infected 3D4/21 cells; D. *HIF*-1α mRNA levels in PRRSV-infected3D4/21 cells. * represents significant difference ($P<0.05$) and ** represents very significant difference ($P<0.01$). The same below.

图 1　PRRSV 对猪肺脏和肺泡巨噬细胞 3D4/21 HIF-1α 表达的影响

Fig. 1　Effects of PRRSV on HIF-1α expression in porcine lung and 3D4/21 alveolar macrophages

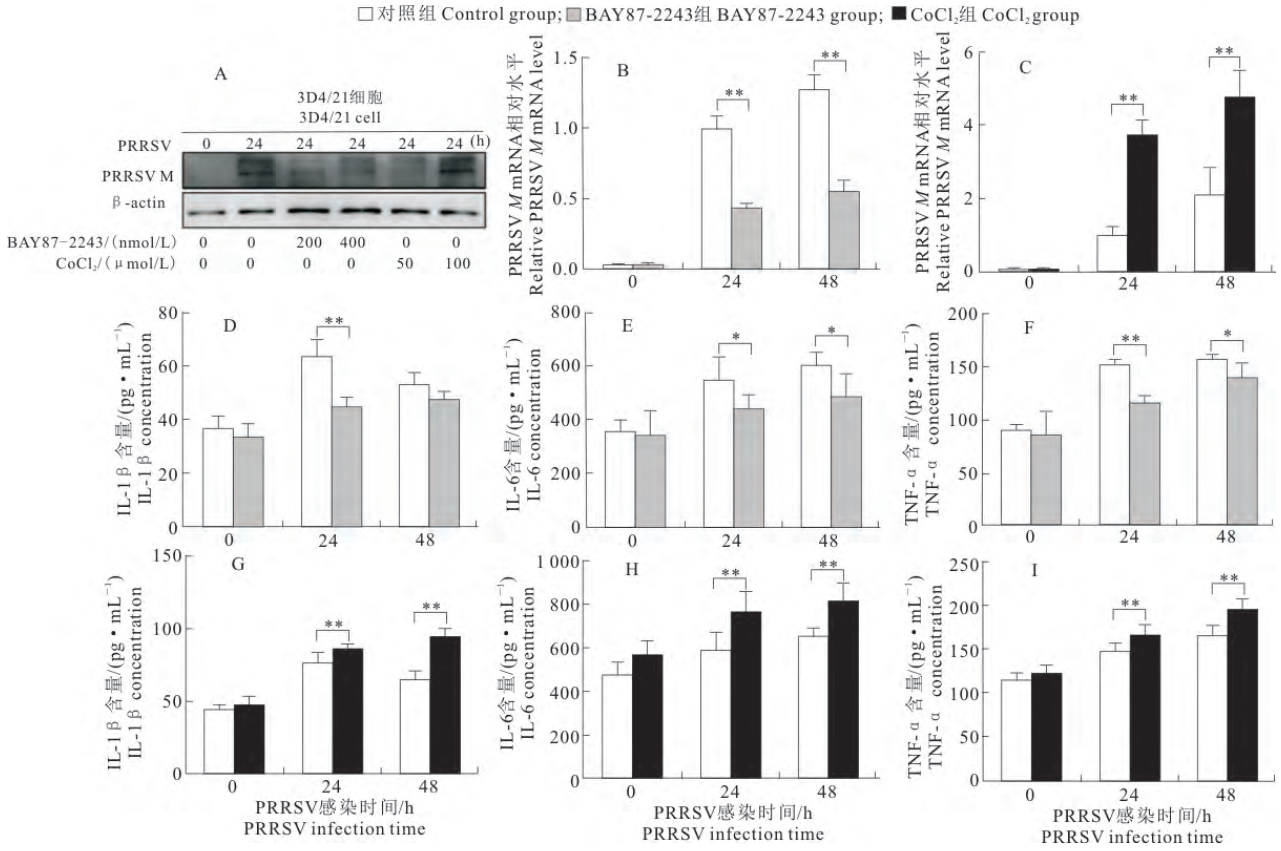
2.2　HIF-1α 对 PRRSV 诱导炎症的作用

HIF-1α 对 PRRSV 诱导猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 炎症反应的作用如图 2 所示。Western Blot 试验结果显示，$CoCl_2$ 可促进 3D4/21 细胞内 PRRSV M 蛋白的表达，而 BAY87-2243 可抑制 M 蛋白的表达（图 2-A）；RT-qPCR 试验结果显示，与 PRRSV 组相比，添加 BAY87-2243 可极显著抑制 3D4/21 细胞内 PRRSV *M* 基因 mRNA 表达（$P<0.01$），而 $CoCl_2$ 可极显著促进 PRRSV *M* 基因 mRNA 表达（$P<0.01$）（图 2-B、C）。进一步使用 ELISA 试剂盒检测 HIF-1α 对炎症细胞因子表达的作用，结果显示，与 PRRSV 组相比，PRRSV＋BAY87-2243 组细胞上清液中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量大多显著或极显著降低（图 2-D、E、F），而 PRRSV＋$CoCl_2$ 组细胞上清液中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量均极显著升高（图 2-G、H、I）。结果表明，HIF-1α 对 PRRSV 诱导猪肺泡巨噬细胞炎症细胞因子表达有显著促进作用。

2.3　mTOR 对 PRRSV 诱导炎症的作用

mTOR 对 PRRSV 诱导猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 炎症反应的作用如图 3 所示。试验结果显示，与 CK 组相比，PRRSV 组 p-mTOR 和 mTOR 的表达水平升高；与 PRRSV 组相比，PRRSV＋R 组 HIF-1α 蛋白表达被抑制，p-mTOR 蛋白表达水平降低；PRRSV＋R＋C 组能够提高细胞 HIF-1α 的表达量，而对 p-mTOR 的表达无明显作用（图 3-A）。炎症细胞因子表达如图 3-B、C、D 所示，与 PRRSV 组相比，PRRSV＋R 组细胞上清液中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的含量均显著或极显著降低；与 PRRSV＋R 组相比，PRRSV＋R＋C 组 IL-1β 和 TNF-α 的含量均显著升高（$P<0.05$），IL-6 的含量有升高趋势，但无显著差异（$P>0.05$）。试验结果表明，PRRSV 可能通过 mTOR 调控 HIF-1α 的表达，进而促进炎症细胞因子表达。

中国知网　https://www.cnki.net

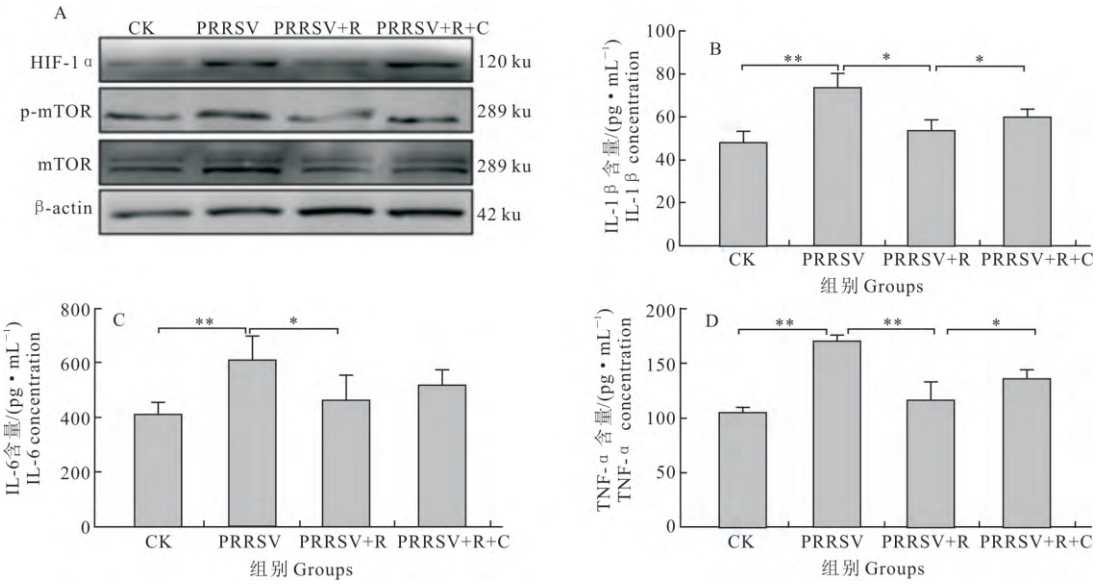


A. 不同抑制剂对PRRSV M蛋白表达影响;B和C. 不同抑制剂对3D4/21细胞PRRSV *M* mRNA水平影响;D～I. 不同抑制剂对3D4/21细胞IL-1β、IL-6和TNF-α含量的影响。

A. Effects of different inhibitors on the expression of PRRSV M protein; B and C. Effects of different inhibitors on PRRSV *M* mRNA levels in 3D4/21 cells; D—I. Effects of different inhibitors on the levels of IL-1 β, IL-6, and TNF-α in 3D4/21 cells.

图2 HIF-1α对PRRSV诱导猪肺泡巨噬细胞3D4/21炎症反应的影响

Fig. 2 Effects of HIF-1α on PRRSV-induced inflammatory responses in porcine 3D4/21 alveolar macrophages



A. Rapa和$CoCl_2$对HIF-1α和mTOR蛋白表达的影响;B～D. mTOR对3D4/21细胞IL-1β、IL-6和TNF-α含量的影响。

A. Effects of Rapa and $CoCl_2$ on HIF-1 α and mTOR protein expression; B—D. Effects of mTOR on IL-1 β, IL-6 and TNF-α levels in 3D4/21 cells.

图3 mTOR对PRRSV诱导猪肺泡巨噬细胞3D4/21炎症反应的影响

Fig. 3 Effects of mTOR on PRRSV-induced inflammatory responses in porcine 3D4/21 alveolar macrophages

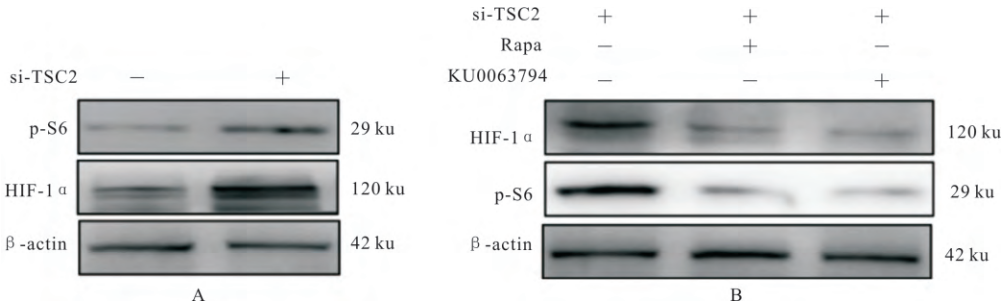
中国知网 https://www.cnki.net

2.4　mTORC1 调控 HIF-1α 表达的机制

试验结果显示，转染 si-TSC2 抑制 TSC2 可使 mTOR 活化的猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 中 p-S6 和 HIF-1α 蛋白含量均显著升高（图 4-A），表明上调 mTOR 的表达能促进 HIF-1α 表达，mTOR 对 HIF-1α 蛋白可能具有调控作用。Western Blot 结果显示，抑制剂 Rapa 和 KU0063794 均能抑制猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 p-S6 蛋白表达，Rapa 抑制 mTORC1 活性后猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 HIF-1α 的表达量明显降低，而与 Rapa 处理组相比，KU0063794 组细胞 HIF-1α 表达没有被更明显地抑制（图 4-B），表明 mTOR 蛋白主要通过 mTORC1 上调 HIF-1α 表达。

2.5　PRRSV 通过 mTORC1 上调 HIF－1α 促进炎症因子的表达

Western Blot 结果显示，过表达 mTORC1 的 3D4/21 细胞在感染 PRRSV 后，mTORC1 下游靶点 p-S6 表达升高，HIF-1α 水平上调，PRRSV M 蛋白水平提高（图 5-A）。与 CK 组相比，mTORC1 过表达试验组细胞上清液中 IL-1β 含量极显著升高（$P<0.01$），IL-6 和 TNF-α 的含量均显著升高（$P<0.05$）（图 5-B、C、D）。试验结果表明，PRRSV 通过 mTORC1 调控 HIF-1α 促进炎症细胞因子表达。

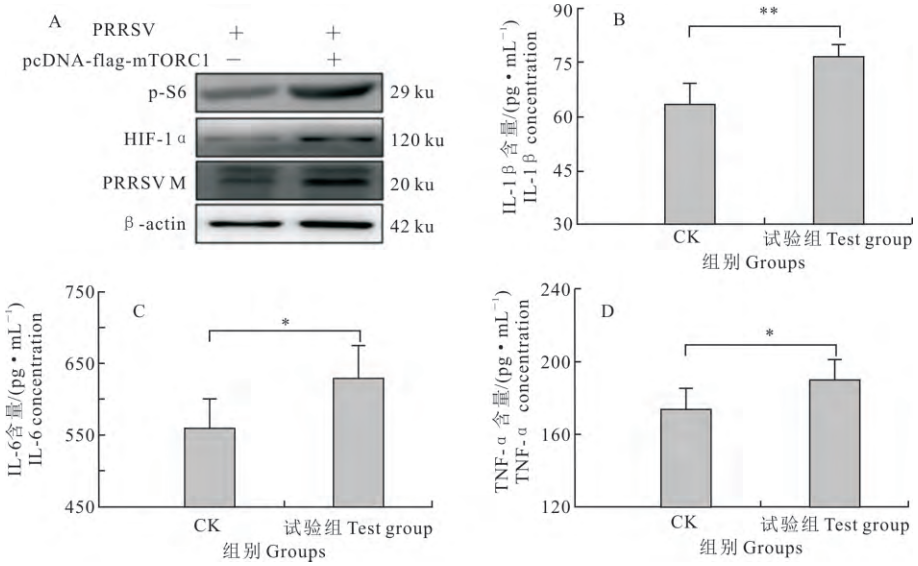


A. si-TSC2 对 HIF-1α 表达的作用；B. si-TSC2 和 Rapa 对 HIF-1α 蛋白表达的作用。

A. Effects of si-TSC2 on HIF-1 α expression; B. Effects of si-TSC2 and Rapa on HIF-1 α protein expression.

图 4　mTOR 对猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 HIF-1α 表达的影响

Fig. 4　Effects of mTOR on the expression of HIF-1α in porcine 3D4/21 alveolar macrophages



A. 过表达 mTORC1 对 p-S6、HIF-1α 和 PRRSV M 蛋白表达的作用；B～D. 过表达 mTORC1 对 PRRSV 感染 3D4/21 细胞上清液中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量的影响。

A. Effects of mTORC1 overexpression on p-S6, HIF-1α and PRRSV M protein expression; B－D. Effects of mTORC1 overexpression on IL-1 β, IL-6, and TNF-α levels in supernatant of PRRSV-infected 3D4/21 cells.

图 5　mTORC1 对 PRRSV 诱导猪肺泡巨噬细胞 3D4/21 炎症因子表达的促进作用

Fig. 5　Promoting effects of mTORC1on PRRSV-induced inflammatory cytokine expression in porcine 3D4/21 alveolar macrophages

中国知网　https://www.cnki.net

3 讨 论

PRRSV可导致猪的繁殖障碍和严重的呼吸困难,是危害生猪生产最重要的疾病之一,给全球养猪业造成重大的经济损失。肺脏是PRRSV侵袭的主要器官,猪肺泡巨噬细胞是PRRSV的主要靶细胞和感染期间病毒复制的主要场所。PRRSV造成猪群呼吸困难可能是肺部炎症细胞因子释放的结果,促炎细胞因子IL-1β、IL-6和TNF-α等高度表达,迅速引起肺水肿、出血、肺炎和毛细支气管炎[17-19]。免疫细胞感染病毒后能量代谢由氧化磷酸化代谢转变为有氧糖酵解代谢[20],这种转变称为"Warburg效应"。这种代谢重编程可能通过诱导细胞内缺氧微环境,激活具有广泛靶基因谱的转录活性核蛋白HIF-1α,其可调控缺氧适应、糖酵解代谢及炎症反应(如IL-1β、IL-6等)相关的近100种靶基因[21]。本研究发现,PRRSV感染的仔猪肺脏和3D4/21细胞中HIF-1α蛋白和mRNA表达量升高,并且HIF-1α表达与mTOR信号通路有关,主要受mTORC1调控。

已有的研究表明,HIF-1α和糖酵解途径的代谢物能够促进炎症,HIF-1α直接或间接参与了免疫反应调控,并且在此过程中发挥着重要的作用[21-22]。研究发现,HIF-1α可促进SARS-CoV-2、IAV复制,诱导炎性细胞因子表达,抑制HIF-1α会下调炎性细胞因子表达量[23-24]。PANG等[25]研究表明,PRRSV nsp1β可通过抑制HIF-1α泛素化降解而发挥稳定HIF-1α蛋白作用。本研究结果显示,HIF-1α蛋白及mRNA在正常肺脏和3D4/21细胞中含量较低,而在感染PRRSV后蛋白含量迅速升高3~4倍,mRNA转录水平提高2~3倍,表明PRRSV感染促进了肺脏组织和3D4/21细胞内HIF-1α mRNA转录及蛋白翻译,在感染过程中HIF-1α含量维持在较高水平。用BAY87-2243抑制HIF-1α后,PRRSV诱导IL-1β、IL-6和TNF-α炎症细胞因子水平显著降低,而$CoCl_2$则具有相反的作用,表明PRRSV可通过提高HIF-1α含量而促进炎症细胞因子表达。试验结果表明,HIF-1α通过诱导IL-1β等炎症因子间接促进PRRSV复制,提示病毒可能同时利用"直接蛋白稳定"和"炎症微环境重塑"双策略增强复制能力。

研究表明,抑制mTOR可显著降低HIF-1α含量,同时炎症因子表达下降,表明mTOR-HIF-1α轴在炎症因子网络中具有核心调控作用[26]。本研究结果显示,PRRSV感染3D4/21细胞后,mTOR磷酸化水平升高,表明PRRSV感染可促进mTOR磷酸化,进而促进mTOR表达,与现有研究报道[27]一致。mTOR抑制剂Rapa处理组3D4/21细胞内HIF-1α蛋白的水平降低,而在Rapa基础上同时添加HIF-1α的稳定剂$CoCl_2$后可提高HIF-1α蛋白水平。ELISA结果显示,mTOR抑制剂Rapa可降低PRRSV感染诱导IL-1β、IL-6和TNF-α细胞因子水平,在Rapa基础上同时添加HIF-1α的稳定剂$CoCl_2$后IL-1β、IL-6和TNF-α细胞因子显著回升。试验结果表明,PRRSV可通过促进mTOR磷酸化而调节细胞内HIF-1α的水平,进而促进炎症细胞因子的产生。

TSC2突变失活或缺失会导致mTOR过度活化。本试验使用TSC2的特异性siRNA抑制TSC2表达活化mTOR,结果显示HIF-1α蛋白水平升高,表明mTOR能调控HIF-1α蛋白,这与SAXTON等[28]的研究结果一致。在mTOR活化的细胞中使用mTORC1抑制剂Rapa,HIF-1α蛋白水平显著降低;在mTOR活化的细胞中使用mTORC1和mTORC2的抑制剂KU0063794,HIF-1α蛋白水平没有更明显的降低,表明mTOR蛋白主要通过mTORC1调控HIF-1α表达。为了进一步检测mTORC1在PRRSV调控HIF-1α表达中的作用,将mTORC1过表达质粒转染3D4/21细胞,mTORC1过表达后其下游靶点p-S6表达水平升高,而且HIF-1α、PRRSV M蛋白水平和IL-6、TNF-α含量均显著升高,表明提高mTORC1蛋白水平可促进PRRSV诱导的HIF-1α蛋白表达,进而促进炎症细胞因子表达。

[参考文献]

[1] YU Y, ZHANG Q, CAO Z, et al. Recent advances in porcine reproductive and respiratory syndrome virus NADC30-like research in China: molecular characterization, pathogenicity, and control[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 791313.

[2] ZHOU L, HAN J, YANG H C. The evolution and diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. Veterinary Microbiology, 2024, 298: 110252.

[3] GAO P, LIU Y Y, WANG H, et al. Viral evasion of PKR restriction by reprogramming cellular stress granules[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2022, 119(29): e2201169119.

[4] 魏春华,刘建奎,戴爱玲,等. 福建NADC30-like PRRSV FJLY01株的全基因组分子特征分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然

中国知网 https://www.cnki.net

科学版），2017，45(3)：51-60，67.
WEI C H，LIU J K，DAI A L，et al. Whole genome molecular feature analysis of Fujian NADC30-like PRRSV FJLY01 strain [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)，2017，45(3)：51-60，67.

[5] CHEN D J，XU S K，JIANG R J，et al. IL-1β induced by PRRSV co-infection inhibited CSFV C-strain proliferation via the TLR4/NF-κB/MAPK pathways and the NLRP3 inflammasome[J]. Veterinary Microbiology，2022，273：109513.

[6] MA Y，HAN Y，WANG P，et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus activates lipid synthesis through a ROS-dependent AKT/PCK1/INSIG/SREBPs axis[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2024，282：136720.

[7] LI H W，YANG X T，SONG Y Z，et al. PRRSV infection activates NLRP3 inflammasome through inducing cytosolic mitochondrial DNA stress[J]. Veterinary Microbiology，2023，279：109673.

[8] FAN J，LV H，LI J，et al. Roles of Nrf2/HO-1 and HIF-1α/VEGF in lung tissue injury and repair following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Journal of Cellular Physiology，2019，234(6)：7695-7707.

[9] HU L，ZENG Z，XIA Q，et al. Metformin attenuates hepatoma cell proliferation by decreasing glycolytic flux through the HIF-1α/PFKFB3/PFK1 pathway [J]. Life Sciences，2019，239：116966.

[10] ZHUANG X，PEDROZA-PACHECO I，NAWROTH I，et al. Hypoxic microenvironment shapes HIV-1 replication and latency [J]. Commun Biol，2020，3(1)：376.

[11] MOIN S M，CHANDRA V，ARYA R，et al. The hepatitis E virus ORF3 protein stabilizes HIF-1alpha and enhances HIF-1-mediated transcriptional activity through p300/CBP[J]. Cellular Microbiology，2009，11(9)：1409-1421.

[12] MORRIS D R，QU Y，AGRAWAL A，et al. HIF-1alpha modulates core metabolism and virus replication in primary airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus [J]. Viruses，2020，12(10)：1088.

[13] SÁNCHEZ-CARVAJAL J M，RODRÍGUEZ-GÓMEZ I M，RUEDAS-TORRES I，et al. Activation of pro-and anti-inflammatory responses in lung tissue injury during the acute phase of PRRSV-1 infection with the virulent strain Lena[J]. Veterinary Microbiology，2020，246：108744.

[14] EATON C W，VU H L，HODGES A L，et al. Host-genetic-based outcome of co-infection by PCV2b and PRRSV in pigs [J]. Journal of Animal Science，2023，3(101)：1-10.

[15] 段滇宁，李雅楠，梁燕娇，等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒诱导巨噬细胞糖酵解促进病毒复制[J]. 生物工程学报，2024，40(12)：4546-4556.
DUAN D N，LI Y N，LIANG Y J，et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces macrophage glycolysis to promote virus replication[J]. Chinese Journal of Biotechnology，2024，40 (12)：4546-4556.

[16] LIU J K，LIU C，XU Y，et al. Molecular characteristics and pathogenicity of a novel recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain from NADC30-，NADC34-，and JXA1-like strains that emerged in China[J]. Microbiology Spectrum，2022，10(6)：e02667-02622.

[17] HAN D，HU Y，LI L，et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection results in acute lung injury of the infected pigs[J]. Veterinary Microbiology，2014，169(3/4)：135-146.

[18] GUO B，LAGER K M，HENNINGSON J N，et al. Experimental infection of United States swine with a Chinese highly pathogenic strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virology，2013，435(2)：372-384.

[19] 孙盼盼，曹志刚，凌小雅，等. 苦参碱联合不同抗生素抗炎作用比较研究[J]. 畜牧兽医学报，2023，54(10)：4411-4421.
SUN P P，CAO Z G，LING X Y，et al. Comparative study on the anti-inflammatory effects of matrine combined with different antibiotics [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica，2023，54(10)：4411-4421.

[20] HOTAMISLIGIL G S. Inflammation，metaflammation and immunometabolic disorders [J]. Nature，2017，542 (7640)：177-185.

[21] MCGETTRICK A F，O'NEILL L A J. The role of HIF in immunity and inflammation [J]. Cell Metab，2020，32 (4)：524-536.

[22] REYES A，CORRALES N，GALVEZ N M S，et al. Contribution of hypoxia inducible factor-1 during viral infections[J]. Virulence，2020，11(1)：1482-1500.

[23] TIAN M，LIU W，LI X，et al. HIF-1α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19 [J]. Signal Transduction and Targeted Therapy，2021，6 (1)：308.

[24] ZHU B，WU Y，HUANG S，et al. Uncoupling of macrophage inflammation from self-renewal modulates host recovery from respiratory viral infection [J]. Immunity，2021，54 (6)：1200-1218. e1209.

[25] PANG Y，ZHOU Y，WANG Y，et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp1β stabilizes HIF-1α to enhance viral replication [J]. Microbiology Spectrum，2022，10 (6)：e03173-03122.

[26] SHI L Z，WANG R，HUANG G，et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells[J]. Journal of Experimental Medicine，2011，208(7)：1367-1376.

[27] WEI R，ZHANG X，WANG X，et al. PDCD4 restricts PRRSV replication in an eIF4A-dependent manner and is antagonized by the viral nonstructural protein 9[J]. Journal of Virology，2024，98(5)：e00060-00024.

[28] SAXTON R A，SABATINI D M. mTOR signaling in growth，metabolism，and disease[J]. Cell，2017，169(2)：361-371.

（责任编辑：马秋明）

中国知网　https://www.cnki.net