

• 动物及兽医生物技术 •

血管紧张素转换酶 2 通过抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路抵抗传染性支气管炎病毒诱导细胞炎症反应

纪晓霞, 王换换, 马畅, 李志强, 杜欣雨, 张源淑*

南京农业大学 农业农村部动物生理生化重点实验室, 江苏 南京 210095

纪晓霞, 王换换, 马畅, 李志强, 杜欣雨, 张源淑. 血管紧张素转换酶 2 通过抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路抵抗传染性支气管炎病毒诱导细胞炎症反应[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2669-2683.

Ji Xiaoxia, WANG Huanhuan, MA Chang, LI Zhiqiang, DU Xinyu, ZHANG Yuanshu. Angiotensin converting enzyme 2 alleviates infectious bronchitis virus-induced cellular inflammation by suppressing IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2669-2683.

摘 要: 为探讨血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)对传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)诱导细胞炎症反应的调控作用及其机制,本研究以 IBV 重组病毒 (IBV-3ab-Luc)分别感染 Vero 和 DF-1 细胞,并设立对照组、感染组[IBV-3ab-Luc, 感染复数 (multiplicity of infection, MOI)=1]、ACE2 过表达组[IBV-3ab-Luc+pcDNA3.1(+)-ACE2]及 ACE2 缺失组(IBV-3ab-Luc+siRNA-ACE2)。待感染组出现合胞体等明显细胞病变后,提取各组细胞总蛋白质和 RNA,免疫荧光及免疫印迹试验(Western blotting)鉴定 ACE2 的过表达与缺失;实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测细胞中 IBV 核衣壳 (nucleoprotein, N)、糖蛋白 130 (glycoprotein 130, gp130)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)等炎症因子的 mRNA 表达水平;酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法测定细胞上清中 IL-6 水平;Western blotting 检测细胞中 ACE2 表达和酪氨酸蛋白激酶 2 (janus kinase 2, JAK2)、信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)磷酸化水平。结果表明, Vero 和 DF-1 两种细胞均成功实现 ACE2 的过表达与缺失。IBV 感染可导致 Vero 细胞变圆、脱落和聚堆,有明显合胞体出现;ACE2 过表达后细胞病变减轻;缺失后细胞病变增强。与对照组相比,感染组 IBV-N、IL-6 和 gp130 mRNA 表达均显著上调($P<0.05$),细胞上清中 IL-6 水平显著或极显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);ACE2 蛋白表达显著下调($P<0.05$),JAK2 和 STAT3 蛋白磷酸化水平显著上调($P<0.05$)。与感染组相比,ACE2 过表达组 IBV-N 基因 mRNA 表达水平无显著变化(DF-1 细胞) ($P>0.05$),但 gp130 mRNA 表达, IL-6 水平及 mRNA 表达, JAK2、STAT3 蛋白磷酸

资助项目: 国家自然科学基金(31972640)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31972640).

*Corresponding author. Tel: +86-25-84398669, E-mail: zhangyuanshu@njau.edu.cn

Received: 2022-11-29; Accepted: 2023-03-09; Published online: 2023-03-19

化水平显著下调($P<0.05$); 缺失组 IBV-N 也无显著变化($P>0.05$), 但 IL-6 水平及 mRNA 表达显著上调($P<0.05$), JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化水平略下调($P>0.05$)。结果首次证实 ACE2 对 IBV 在 DF-1 细胞中的复制无明显影响, 但在 IBV 诱导 Vero、DF-1 细胞炎症反应中通过抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路发挥一定的抵抗作用。

关键词: 血管紧张素转换酶 2; 鸡传染性支气管炎病毒; 炎症反应; IL-6/JAK2/STAT3 通路

Angiotensin converting enzyme 2 alleviates infectious bronchitis virus-induced cellular inflammation by suppressing IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway

JI Xiaoxia, WANG Huanhuan, MA Chang, LI Zhiqiang, DU Xinyu, ZHANG Yuanshu*

Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: The goal of this study was to investigate the regulatory effect of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) on cellular inflammation caused by avian infectious bronchitis virus (IBV) and the underlying mechanism of such effect. Vero and DF-1 cells were used as test target to be exposed to recombinant IBV virus (IBV-3ab-Luc). Four different groups were tested: the control group, the infection group [IBV-3ab-Luc, MOI (multiplicity of infection)=1], the ACE2 overexpression group [IBV-3ab Luc+pcDNA3.1(+)-ACE2], and the ACE2-depleted group (IBV-3ab-Luc+siRNA-ACE2). After the cells in the infection group started to show cytopathic indicators, the overall protein and RNA in cell of each group were extracted. real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to determine the mRNA expression level of the IBV nucleoprotein (IBV-N), glycoprotein 130 (gp130) and cellular interleukin-6 (IL-6). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the level of IL-6 in cell supernatant. Western blotting was performed to determine the level of ACE2 phosphorylation of janus kinase 2 (JAK2) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). We found that ACE2 was successfully overexpressed and depleted in both Vero and DF-1 cells. Secondly, cytopathic indicators were observed in infected Vero cells including rounding, detaching, clumping, and formation of syncytia. These indicators were alleviated in ACE2 overexpression group but exacerbated when ACE2 was depleted. Thirdly, in the infection group, comparing with the control group, the expression level of IBV-N, gp130, IL-6 mRNA and increased significantly ($P<0.05$), the IL-6 level was significant or extremely significant elevated in cell supernatant ($P<0.05$ or $P<0.01$); the expression of ACE2 decreased significantly ($P<0.05$); protein phosphorylation level of JAK2 and STAT3 increased significantly ($P<0.05$). Fourthly, comparing with the infected group, the level of IBV-N mRNA expression in the ACE2 overexpression group had no notable change ($P>0.05$), but the expression of gp130 mRNA, IL-6 level and expression of mRNA were elevated ($P<0.05$) and

the protein phosphorylation level of JAK2 and STAT3 decreased significantly ($P<0.05$). In the ACE2-depleted group, there was no notable change in IBV-N ($P>0.05$), but the IL-6 level and expression of mRNA increased significantly ($P<0.05$) and the phosphorylation level of JAK2 and STAT3 protein decreased slightly ($P>0.05$). The results demonstrated for the first time that ACE2 did not affect the replication of IBV in DF-1 cell, but it did contribute to the prevention of the activation of the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway, resulting in an alleviation of IBV-induced cellular inflammation in Vero and DF-1 cells.

Keywords: angiotensin converting enzyme 2; infectious bronchitis virus; inflammation response; IL-6/JAK2/STAT3 pathway

研究已证实,血管紧张素转换酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2)作为肾素血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的重要调节成员,可促使血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)降解,减轻炎症反应,抵抗组织损伤,且证实 ACE2 的这种抗损伤作用具有广泛性^[1-2]。此外,2003 年有研究发现 ACE2 是严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)冠状病毒的功能性受体,可以有效地与 SARS 冠状病毒的刺突蛋白(spike, S)结合。2020 年,新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)导致全球新型冠状病毒疫情暴发,一些研究人员通过分子模型和体外实验证明 ACE2 同样可以作为 SARS-CoV-2 的受体,同时 SARS、SARS-CoV-2 感染均可导致下调 ACE2 的蛋白表达,而累积的炎症刺激物 Ang II可促使白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等大量细胞因子释放,触发细胞因子风暴^[3]。Monteil 等^[4]和 Kai 等^[5]都证实新型冠状病毒感染(coronavirus disease 2019, COVID-19)患者中使用重组 ACE2,可拮抗 SARS-CoV-2 入侵宿主细胞,减轻肺部炎症,防止其发展至肺功能衰竭,显示了 ACE2 在人类冠状病毒感染中的重要作用。但目前 ACE2 与动物冠状病毒入侵或感染

方面的研究尚未见确切报道。

传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)属于冠状病毒科、 γ 冠状病毒属,是一种单链、包膜、正链 RNA 病毒,可在呼吸道、泌尿道、消化道和生殖道中复制^[6-7],可激活鸡的先天性和适应性免疫反应,促使大量细胞因子释放,病鸡出现呼吸道黏膜浆液卡他性炎症,造成产蛋率下降和肉鸡产量下降,以及继发性细菌感染等导致死亡^[8]。由于 IBV 的血清型和基因型复杂多样,不同毒株之间的疫苗交叉免疫效果不佳,因此目前该病仍然是严重危害家禽业的主要问题之一。

本实验室前期研究证实不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)的 IBV 接种 Vero 细胞,IL-6 等炎症因子的表达随着感染复数的增加而显著上调,ACE2 蛋白的表达随着感染复数的降低而显著下调,但目前有关 ACE2 与 IBV 的关系以及在鸡传染性支气管炎中的作用机制尚未见报道。因此,本研究以鸡重组 IBV 病毒分别感染 Vero 和 DF-1 细胞,并通过过表达和缺失 ACE2,探讨其对 IBV 诱发的细胞炎症反应及 IL-6/酪氨酸蛋白激酶 2 (janus kinase 2, JAK2)/信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)信号通路的影响,以期对鸡传染性支气管炎的临床治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

非洲绿猴肾(Vero)细胞由南京农业大学刘斐教授实验室惠赠,鸡胚成纤维(DF-1)细胞为本实验室保存。

重组 IBV-3ab-Luc 病毒由长江大学农学院方守国实验室惠赠,该病毒通过反向遗传技术将其 3ab 序列替换为荧光素酶基因序列,该病毒其感染特性、增殖特性和遗传稳定性与 IBV Beaudette 株基本相同。

pcDNA3.1(+)-ACE2 质粒为本实验室保存。无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级鸡胚购自南京特给力种植专业合作社。

1.2 主要试剂及仪器

JAK2、STAT3、磷酸化 JAK2 (Tyr1007+1008)、磷酸化 STAT3 (Y705)抗体均购自南京巴傲得生物技术有限公司;ACE2 单克隆抗体购自 Abcam 公司;鼠抗鸡源 ACE2 多克隆抗体为本实验室保存;鸡白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒购自江苏酶免实业有限公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自南京生兴生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的 IgG 二抗购自生工生物工程(上海)股份有限公司;聚氰基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白质定量试剂盒、蛋白质裂解液购自上海碧云天生物技术公司;聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自 Millipore 公司;2 \times 通用型 SYBR Green 荧光酶购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)液购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

Tecan-Spark 酶标仪(TECAN 公司);发光图像分析系统(Tanon 公司);LWD200-37T 显微镜(CEWEI 公司);5804R 低温高速离心机(Eppendorf

公司);电泳/电转仪(Bio-Rad 公司)等。

1.3 引物设计和合成

利用 Primer Premier 5.0 设计 siRNA-ACE2, IBV 核衣壳(nucleoprotein, N)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8)、TNF- α 和糖蛋白 130 (glycoprotein 130, gp130)、 β -actin 引物,引物序列及参数指标见表 1,送至南京擎科生物科技有限公司合成。

1.4 IBV-3ab-Luc 株鸡胚病毒液生产

将 IBV-3ab-Luc 株种毒尿囊腔接种 9 日龄 SPF 鸡胚 10 枚,0.1 mL/胚,另取 5 枚为对照组接种等量生理盐水,密封针孔后置于相对湿度 60%–65%、温度 37 °C 的恒温培养箱中继续孵育。用照蛋器对胚体进行观察,弃掉 24 h 内死亡胚,72 h 后将胚体置于 4 °C 过夜,无菌收集尿囊液,4 °C、5 000 r/min 离心 15 min,取上清并用 0.45 μ m 的滤膜过滤,–80 °C 保存。

1.5 ACE2 过表达细胞的构建和鉴定

参照 Lipofectamine 3000 试剂盒说明书,具体步骤如下:Vero、DF-1 细胞培养于 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,培养条件为 37 °C、5% CO₂ 贴壁培养。当细胞融合达到 70%–80% 时,用含 0.02% EDTA 的 2.5 g/L 胰酶消化。将细胞以 1.5 \times 10⁶/mL 密度接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 60%–70% 时,每孔加入 Opti-MEM 培养液,再加入转染试剂 A 液和 B 液的 1:1 混合液,6 h 后培养液换为 DMEM,另设空白对照,48 h 后分别采用免疫荧光和 Western blotting 鉴定 ACE2 的表达。

免疫荧光鉴定:首先在室温下用 4%多聚甲醛固定细胞爬片,0.5%聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)通透,3%牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)进行封闭。再加入 1:100 稀释的鼠抗鸡 ACE2 多克隆抗体,在 4 °C 过夜孵育,用荧

表 1 基因引物序列及参数

Table 1 Primers used in this study

Primers	Primer sequences (5'→3')	Accession No.	Product length (bp)
siRNA-ACE2-F	GGAGUGGAUGGUGUUUAATT	MK560199	None
siRNA-ACE2-R	UUAAACACCAUCCACCUCCTT		
IBV-N-F	GAGAGGAACAATGCACAGC	DQ001339.1	218
IBV-N-R	CATTTCCTGGCGATAGAC		
gp130-F	AGATGAAGGTGGGAAGGATG	XM-040655417.1	226
gp130-R	CTTGGAGGAGTGTGAGGTGA		
IL-1 β -F	TCGGGTTGGTTGGTGATG	NM-204524.2	214
IL-1 β -R	TGGGCATCAAGGGCTACA		
IL-6-F	CAAGGTGACGGAGGAGGA	NM-204628.2	208
IL-6-R	TGGCGAGGAGGGATTCT		
IL-8-F	AGCACACCTCTCTTC CA	NM-205498.2	194
IL-8-R	GCAAGGTAGGACGCTGGTAA		
TNF- α -F	TACTCAGGACAGCCTATGCCAACA	NM-204267.2	170
TNF- α -R	CACCACACGACAGCCAAGTCAA		
β -actin-F	CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA	XM-100158242	139
β -actin-R	ATTTCTCTCTCGGCT-GTGGTG		

光素 5-异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate, FITC)或德克萨斯红(texas red, TR)标记的 IgG (immunoglobulin G, IgG) (1:1 000 稀释)避光孵育。再加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)避光孵育,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,在激光共聚焦显微镜下观察结果。

Western blotting 鉴定:参照 Wang 等^[9]的方法,将处理完收集的 Vero、DF-1 细胞,提取细胞总蛋白质,BCA 法测定蛋白质浓度。将细胞蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后,采用湿转法(100 V, 90 min)进行 PVDF 膜转印。将 PVDF 膜置于 5% BSA 室温封闭 3 h,然后加入 ACE2 (1:3 000 稀释)在 4 °C 封闭过夜。洗膜后室温下孵育 HRP 标记的 IgG (1:10 000 稀释)。ECL 发光液显色后,在全自动化学发光图像分析系统中观察拍照,使用 Image J 软件分析条带灰度。

1.6 缺失 ACE2 细胞的构建和鉴定

参照 GP-transfect-Mate 说明书,具体步骤:将 Vero、DF-1 细胞以 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板中,待细胞生长密度达 70%–80%时,弃去原培养液,每孔加入 800 μL DMEM 和 200 μL 转染复合物。37 °C 培养细胞,48 h 后,分别采用免疫荧光和 Western blotting 鉴定 ACE2 的表达,具体步骤同 1.5。

1.7 细胞分组处理及样品收集

将 $1.5 \times 10^6/\text{mL}$ Vero 和 DF-1 细胞接种在 6 孔板中,待细胞融合至 70%–80%时,按如下分组进行处理:(1) 对照组:不做任何处理;(2) IBV 感染组:加入 1 MOI 的 IBV-3ab-Luc 病毒原液;(3) IBV+ACE2 过表达组:将 1 MOI 的 IBV-3ab-Luc 病毒原液加入成功实现 ACE2 过表达的细胞;(4) IBV+ACE2 缺失组:将 1 MOI 的 IBV-3ab-Luc 病毒原液加入成功实现 ACE2 缺失的细胞。

每组设 3 个重复。待病毒吸附 1 h 后, 弃去病毒液, PBS 洗 3 遍, 加入无血清的 DMEM 继续培养。待 70%–80% 的细胞出现明显细胞病变时, 分别提取细胞总 RNA 和蛋白质, 并收集细胞上清液用于后续实验。

1.8 数据测定

1.8.1 细胞 IBV N、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和 gp130 基因相对表达量的检测

将处理完收集的 Vero、DF-1 细胞, 按照 Trizol 一步法提取各组细胞的总 RNA, 紫外分光光度测定浓度后, 反转录合成互补 DNA (complementary DNA, cDNA), -20°C 保存。按下述反应体系进行 RT-qPCR 反应: 2 \times SYBR Green Pro Taq HS Mix 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 7.2 μL 。扩增程序: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 72°C 20 s, 共 40 个循环。数据使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.8.2 细胞上清中 IL-6 水平的检测

采用双抗体夹心 ELISA 方法检测 2 种细胞上清中 IL-6 水平, 具体步骤按照说明书进行: 收集各组 Vero、DF-1 的细胞上清, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清用于后续检测。以空白孔调零, 450 nm 波长测量各孔吸光度值, 根据标准品得出标准曲线及回归方程, 计算细胞上清中 IL-6 的水平。浓度单位为 ng/ μL 。

1.8.3 ACE2、JAK2、磷酸化 JAK2、STAT3 和磷酸化 STAT3 的蛋白表达量的检测

Western blotting 检测中 JAK2、磷酸化 JAK2 (pJAK2)、STAT3、磷酸化 STAT3 (pSTAT3) 的抗体稀释比例皆为 1:1 000, 其余方法同 1.5。

1.9 数据处理

数据用 SPSS 2.0 软件进行统计分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 过表达 ACE2 和缺失的鉴定

免疫荧光试验分析鉴定 ACE2 的分布, 如图 1A 所示: Vero 细胞转染 pcDNA3.1(+)-ACE2 重组质粒组荧光强度(红光)明显强于对照组, 而转染 siRNA-ACE2 免疫荧光强度显著弱于对照组。DF-1 细胞鉴定结果如图 1B 所示, 相比于对照组, 转染 pcDNA3.1(+)-ACE2 组荧光强度(绿光)显著增强, 转染 siRNA-ACE2 组荧光强度显著降低。以上结果表明 pcDNA3.1(+)-ACE2 重组质粒成功转染至 Vero、DF-1 细胞中, 且有较高转染效率。

Vero 细胞中过表达 ACE2 和缺失的鉴定结果如图 2 所示, 与对照组相比, 转染 pcDNA3.1(+)-ACE2 组的细胞中 ACE2 的蛋白表达显著上调($P < 0.05$), 转染 siRNA-ACE2 组的细胞中 ACE2 的蛋白表达显著下调($P < 0.05$), 表明 Vero 细胞中成功实现 ACE2 过表达和缺失。DF-1 细胞中过表达 ACE2 和缺失的鉴定结果如图 3 所示, 结果与 Vero 细胞一致, 即 DF-1 细胞也成功实现 ACE2 过表达和缺失, 均可用于后续实验。

2.2 ACE2 对 IBV 感染 Vero 细胞形态的影响

通过倒置荧光显微镜观察细胞形态, 结果如图 4 所示。对照组 Vero 细胞呈正常的细胞形态, 为典型的上皮细胞铺路石样(图 4A)。感染组细胞出现变圆、脱落、聚堆现象, 可见到明显的合胞体出现(图 4B, 黑色箭头所示)。ACE2 过表达组的细胞病变减轻(图 4C)。ACE2 缺失组 Vero 细胞又出现明显细胞病变, 细胞变圆、皱缩、脱落, 有明显合胞体出现(图 4D, 黑色箭头所示)。

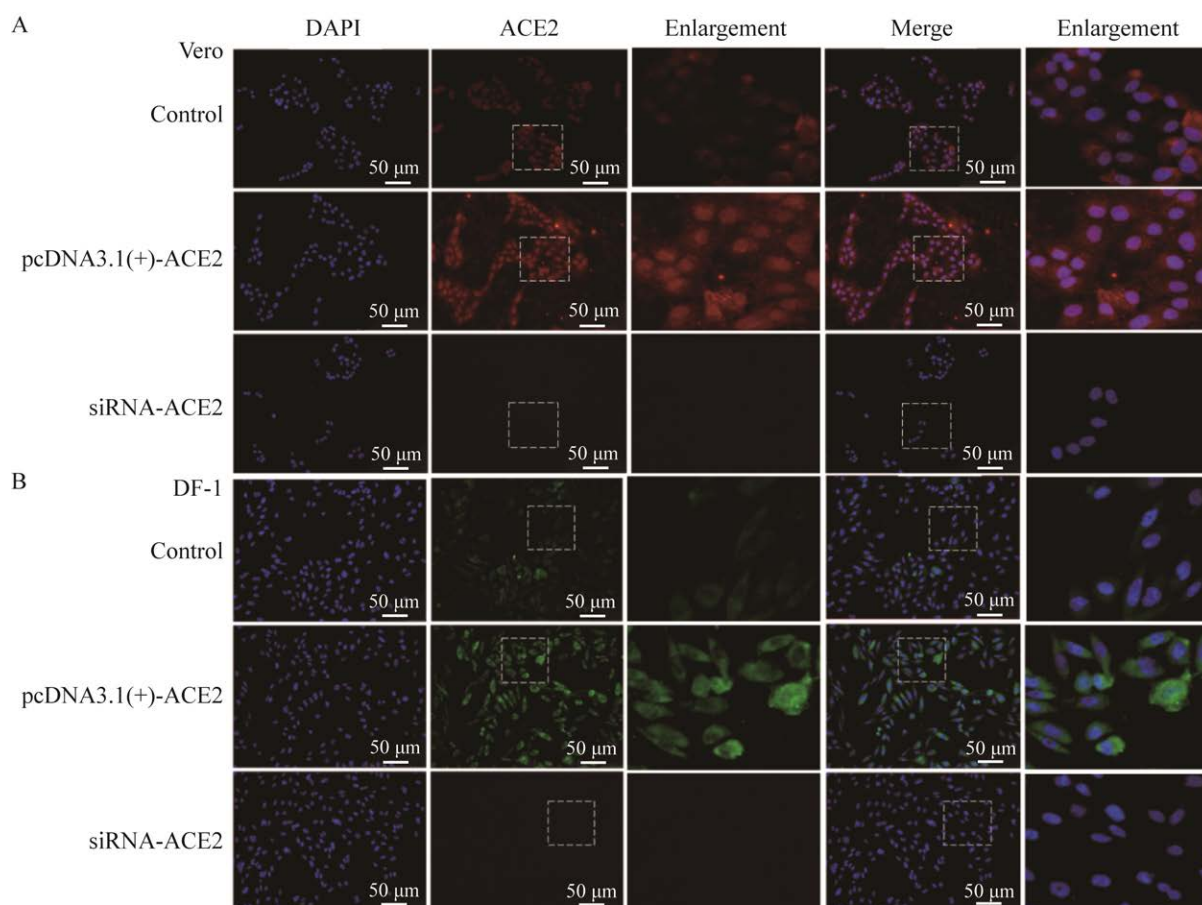


图 1 免疫荧光鉴定细胞 ACE2 的分布

Figure 1 Location of ACE2 in cells identified by immunofluorescence. A: Confocal fluorescent imaging of ACE2 in Vero cells. TR labels the ACE2 protein; DAPI labels the nucleus. B: Confocal fluorescent imaging of ACE2 in DF-1 cells. FITC labels the ACE2 protein; DAPI labels the nucleus.

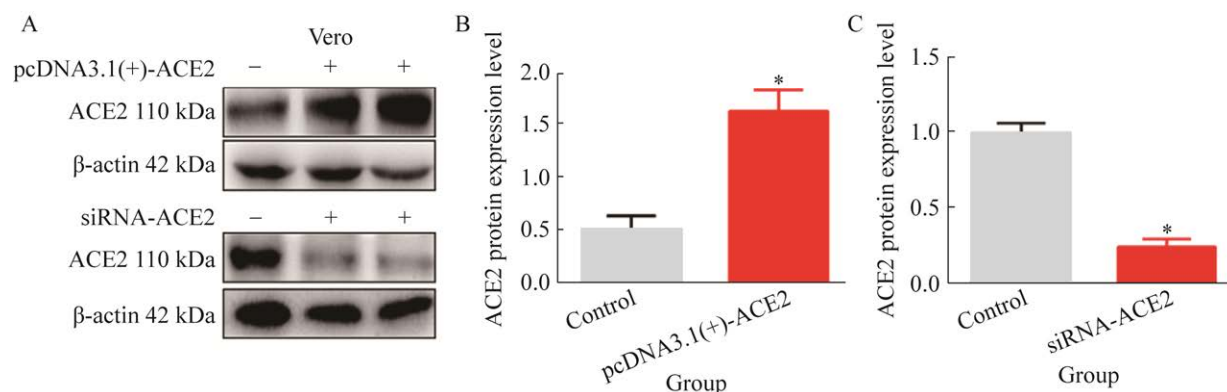


图 2 Western blotting 鉴定 Vero 细胞 ACE2 的表达

Figure 2 Expression of ACE2 in Vero cells identified by Western blotting. A: Band pattern of ACE2 protein expression in Vero cells. B–C: Image J analysis of gray value of ACE2 protein expression in Vero cells. Compared with the control group, * indicates a significant difference ($P < 0.05$). The same below.

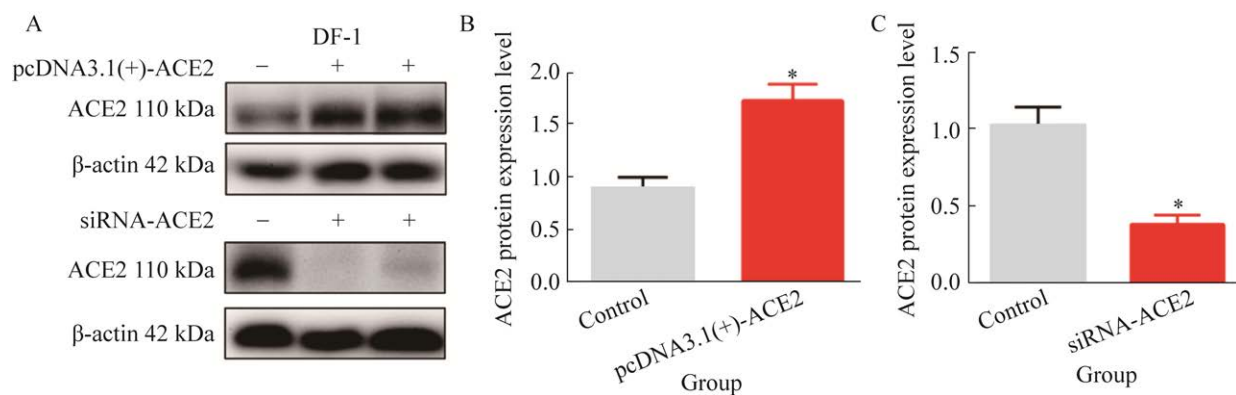


图3 Western blotting 鉴定 DF-1 细胞 ACE2 的表达

Figure 3 Expression of ACE2 in DF-1 cells identified by Western blotting. A: Band pattern of ACE2 protein expression in DF-1 cells. B–C: Image J analysis of gray value of ACE2 protein expression in DF-1 cells.

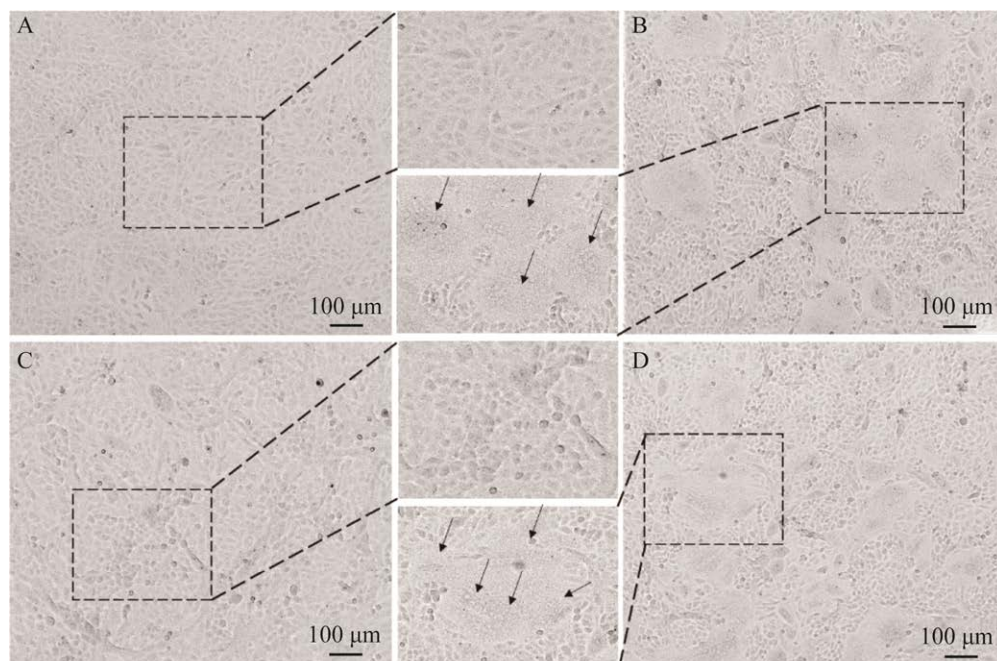


图4 ACE2 对 IBV 感染 Vero 细胞形态的影响

Figure 4 The impact of ACE2 on morphology of Vero cells infected with IBV. A: Control group. B: Infected group. C: Overexpression of ACE2 group. D: Lack of ACE2 group.

2.3 ACE2 对 IBV 感染细胞中 IBV-N 基因的 mRNA 表达的影响

如图 5 所示, 1 MOI 的 IBV 分别感染 Vero 和 DF-1 细胞, 相比于对照组, 感染组、过表达 ACE2 组及缺失组 IBV-N 基因的 mRNA 表达均显著上调($P < 0.05$), 说明 IBV 成功感染细胞。

在 Vero 细胞中, 与感染组相比, ACE2 过表达组和缺失组 IBV-N 基因的 mRNA 表达均显著下调($P < 0.05$) (图 5A)。在 DF-1 细胞中, 与感染组相比, ACE2 过表达组和缺失组 N 基因的 mRNA 表达差异不明显, 无统计学意义($P > 0.05$) (图 5B)。

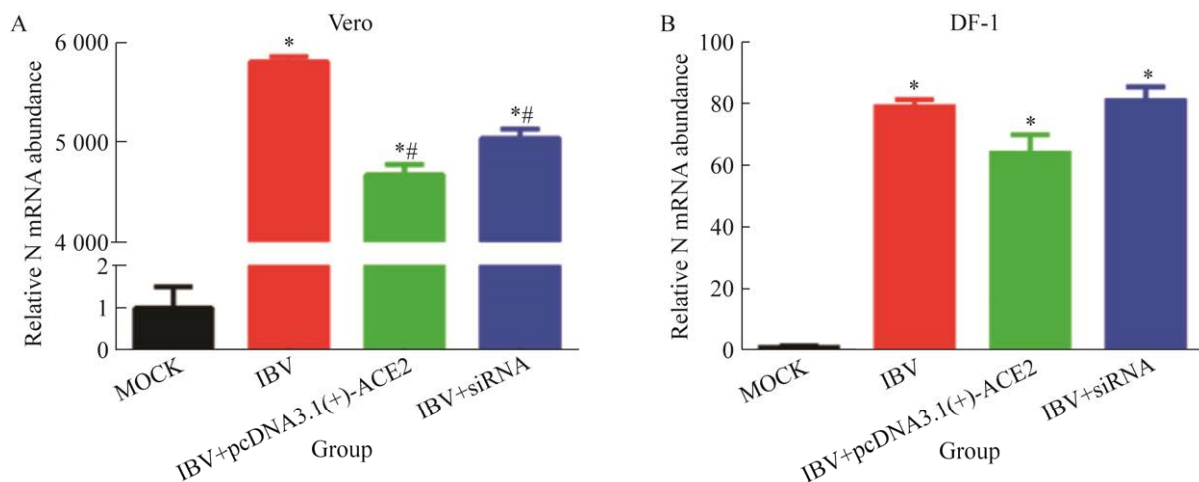


图 5 ACE2 对 IBV 感染细胞中 IBV-N 基因 mRNA 表达的影响

Figure 5 The impact of ACE2 on IBV-N gene mRNA expression in IBV infected cells. A: The impact of ACE2 on IBV-N gene mRNA expression in IBV infected Vero cells. B: The impact of ACE2 on IBV-N gene mRNA expression in IBV infected DF-1 cells. Compared with the mock group, * indicates a significant difference ($P<0.05$), ** indicates an extremely significant difference ($P<0.01$); Compared with the IBV infected group, # indicates a significant difference ($P<0.05$). The same below.

2.4 IBV 感染细胞中 ACE2 蛋白表达的变化

结果如图 6 所示, 与对照组相比, 感染组 Vero 细胞中 ACE2 蛋白表达水平下调; DF-1 细胞中 ACE2 显著下调($P<0.05$), 表明 ACE2 可能在 IBV 感染细胞过程中发挥作用。与感染组相比, 2 种细胞中过表达组 ACE2 蛋白表达均显著上调($P<0.05$), 缺失组 Vero 细胞中 ACE2 蛋白表达略上调($P>0.05$), DF-1 细胞中显著下调($P<0.05$)。

2.5 ACE2 对 IBV 感染细胞中 IL-6 等炎症因子及 gp130 的影响

2.5.1 ACE2 对 IBV 感染细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及 TNF- α 的影响

Vero 细胞中炎症因子结果如图 7A 所示, 与对照组相比, 感染组 IL-8、IL-6 的 mRNA 表达水平显著上调($P<0.05$), 细胞上清中 IL-6 水平极显著上调($P<0.01$), IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 表达差异无统计学意义。与感染组相比, ACE2 过表达组 IL-6 水平和 mRNA 表达显著下调

($P<0.05$); ACE2 缺失组 IL-6 水平和 mRNA 表达显著上调($P<0.05$); IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达变化无统计学意义。

DF-1 细胞中炎症因子结果如图 7B 所示, 与对照组相比, 感染组 IL-1 β 、IL-8 及 TNF- α 的 mRNA 表达水平显著上调($P<0.05$), IL-6 mRNA 表达极显著上调($P<0.01$), 细胞上清中 IL-6 水平显著上调($P<0.05$)。与感染组相比, ACE2 过表达组 IL-6 水平和 mRNA 表达显著下调($P<0.05$), IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达变化无统计学意义; 缺失组 IL-6 水平和 mRNA 表达显著上调($P<0.05$)。结果表明 ACE2 可减少 IBV 所致的细胞中 IL-6 等炎症因子的表达, 缓解炎症反应。

2.5.2 ACE2 对 IBV 感染细胞中 gp130 mRNA 表达变化

通过检测 Vero 和 DF-1 细胞中 gp130 的 mRNA 表达水平发现, 相比于对照组, 感染组 gp130 的 mRNA 表达水平显著上调($P<0.05$)。与

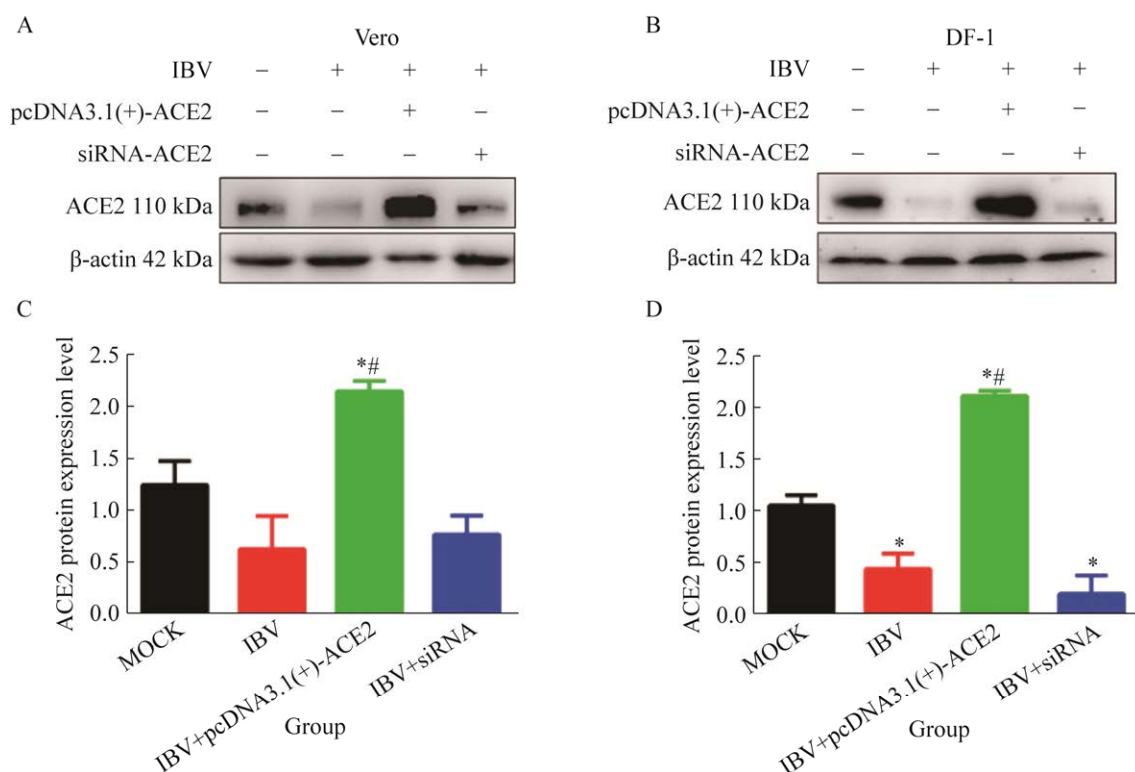


图6 IBV感染细胞中ACE2的蛋白表达变化

Figure 6 Changes of ACE2 protein expression in IBV contaminated cells. Band pattern of ACE2 protein expression in IBV contaminated Vero cells (A) or in IBV contaminated DF-1 cells (B). ImageJ analysis of gray value of ACE2 protein expression in IBV contaminated Vero cells (C) or in IBV contaminated DF-1 cells (D). Compared with the Mock group, * indicates a significant difference ($P<0.05$); Compared with the IBV infected group, # indicates a significant difference ($P<0.05$).

感染组相比, ACE2 过表达组 gp130 的 mRNA 表达水平显著下调($P<0.05$); 缺失组 gp130 的 mRNA 表达水平显著上调($P<0.05$)。

2.6 细胞中 JAK2、STAT3 磷酸化水平的变化

Vero 细胞中 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平如图 8 所示: 与对照组相比, 感染组 JAK2、STAT3 磷酸化水平显著上调($P<0.05$)。与感染组相比, ACE2 过表达组 JAK2 磷酸化水平显著下调($P<0.05$), STAT3 磷酸化水平下调, 无统计学意义; 缺失组 JAK2、STAT3 磷酸化水平略下调, 但无统计学意义。

DF-1 细胞中 JAK2 和 STAT3 磷酸化水平如图 9 所示: 与对照组相比, 感染组 JAK2、STAT3 磷酸化水平显著上调($P<0.05$)。与感染组相比, ACE2 过表达组 JAK2 磷酸化水平下调, STAT3 磷酸化水平显著下调($P<0.05$); 缺失组 JAK2 磷酸化水平上调, STAT3 磷酸化水平略下调, 但无统计学意义。提示: ACE2 抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路活性。

3 讨论与结论

ACE2 是人冠状病毒 NL63 (human coronavirus-NL63, HCoV-NL63)、SARS-CoV 和 SARS-CoV-2

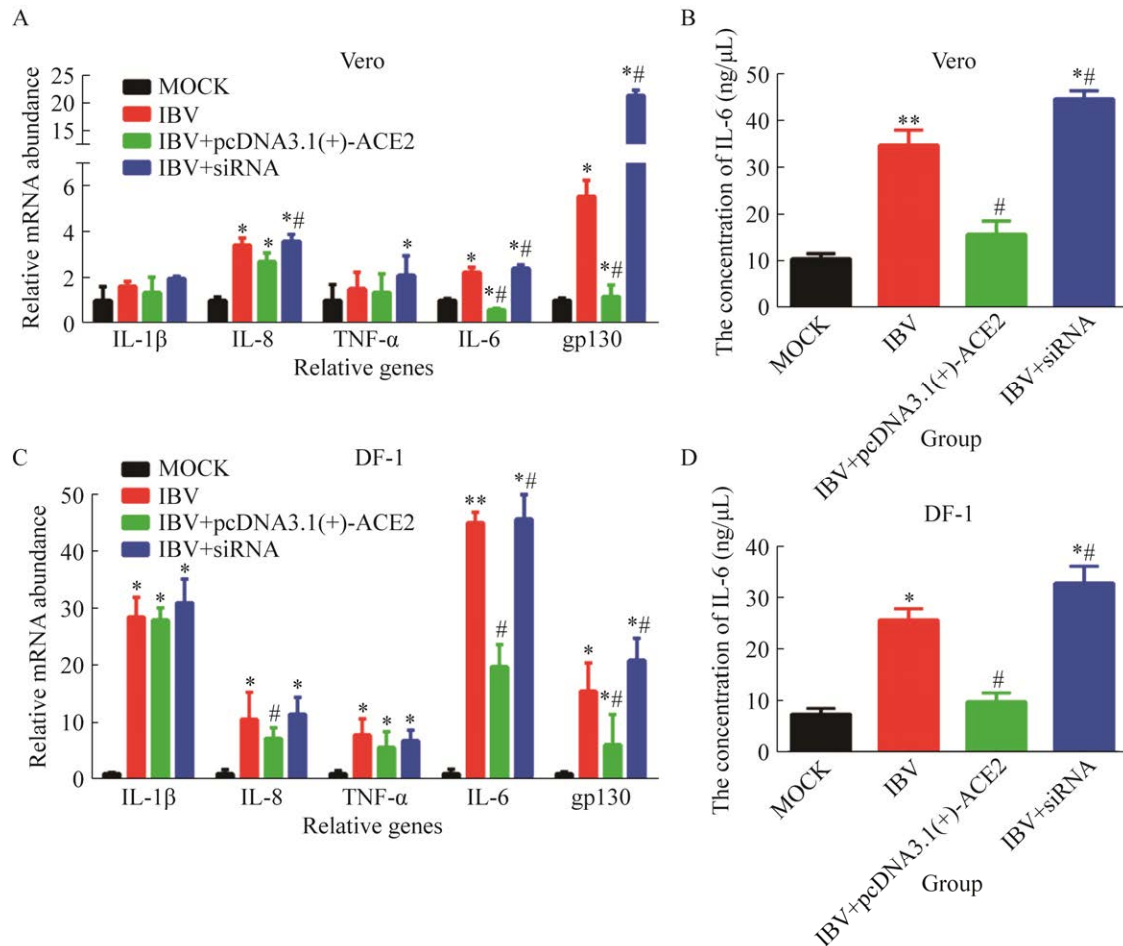


图 7 ACE2 对 IBV 感染细胞中 IL-6 等炎症因子及 gp130 的变化

Figure 7 The impact of ACE2 on the expression of IL-6 and other inflammatory factors and gp130 mRNA in IBV contaminated cells. The impact of ACE2 on the expression of IL-6 and other inflammatory factors and gp130 mRNA in IBV contaminated Vero cells (A & B) or in IBV contaminated DF-1 cells (C & D). Compared with the Mock group, * indicates a significant difference ($P < 0.05$), ** indicates an extremely significant difference ($P < 0.01$); Compared with the IBV infected group, # indicates a significant difference ($P < 0.05$).

的功能性受体, 研究证实 ACE2 在 SARS-CoV、SARS-CoV-2 等冠状病毒感染中发挥双重作用: 一方面 ACE2 可以作为其功能性受体, 通过与其 S 蛋白结合, 协助病毒入侵^[10]; 另一方面 ACE2 通过降解 Ang II 为血管紧张素 1-7 (angiotensin1-7, Ang1-7), 对病毒导致的机体损伤起保护作用^[11-12]。IBV 是唯一引起呼吸道疾病的动物冠状病毒, 其结构蛋白 N 蛋白的主要

功能是结合 RNA、组成核衣壳、与病毒复制密切相关。本研究结果显示 1 MOI 的 IBV 成功感染 Vero、DF-1 细胞后, ACE2 表达均显著下调, 但在 Vero 细胞中缺失组 ACE2 蛋白表达比感染组稍高, 推测这可能反映了 Vero 细胞对 IBV 诱导炎症反应的代偿性保护作用。过表达 ACE2 和缺失导致 IBV 感染 Vero 细胞 N 基因的 mRNA 表达显著下调, 但在 DF-1 细胞中 N 基因的

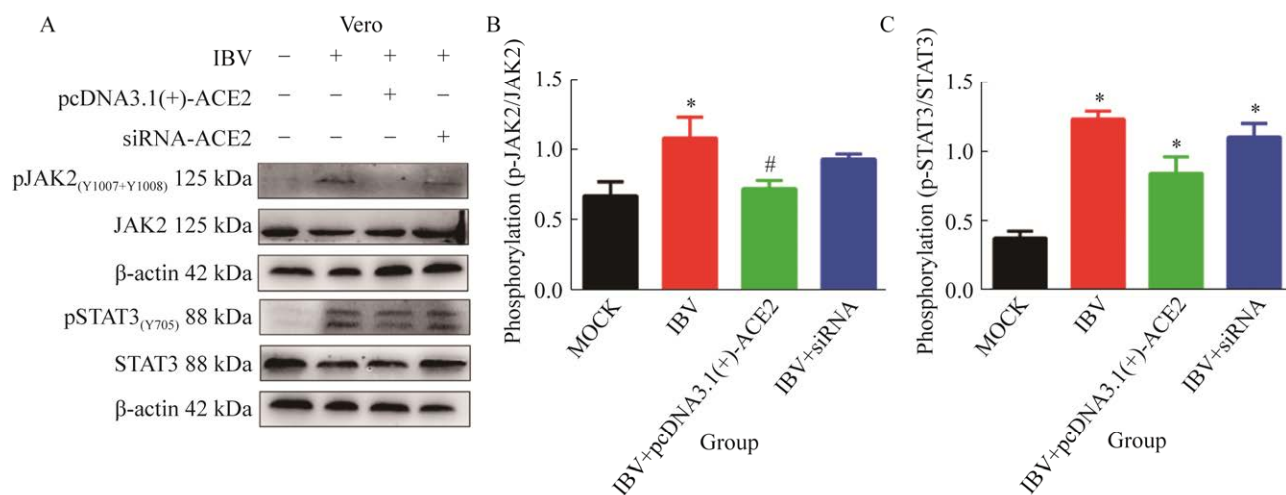


图8 ACE2对IBV感染Vero细胞中JAK2及STAT3磷酸化水平变化

Figure 8 Impact of ACE2 on the phosphorylation of JAK2 and STAT3 in IBV contaminated Vero cells. A: Band pattern of ACE2 on the phosphorylation of JAK2 and STAT3 in IBV contaminated Vero cells by Western blotting. ImageJ analysis of gray value of the phosphorylation of JAK2 (B) or STAT3 (C). Compared with the Mock group, * indicates a significant difference ($P<0.05$); Compared with the IBV infected group, # indicates a significant difference ($P<0.05$).

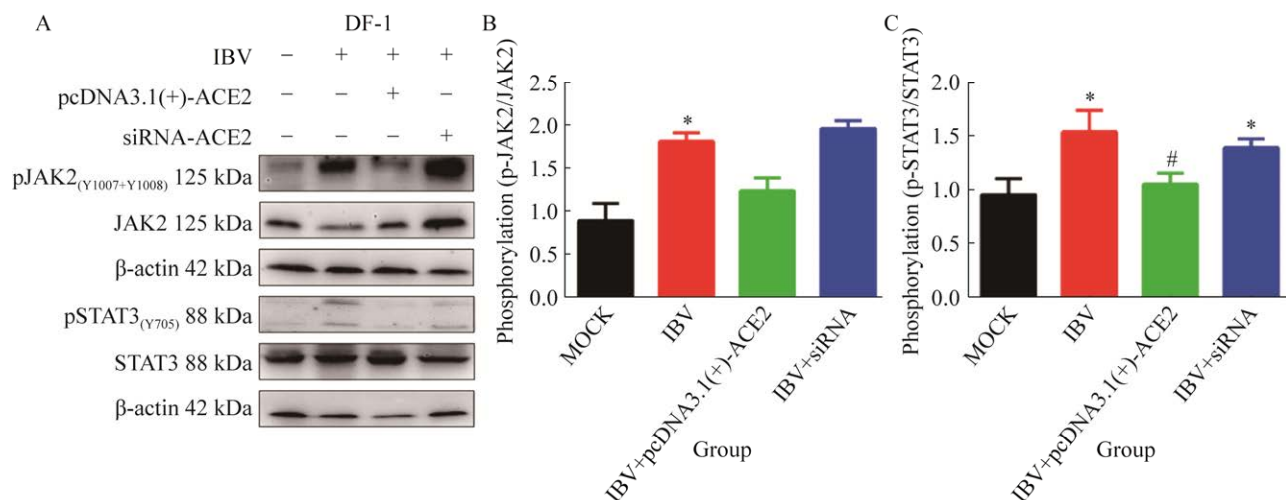


图9 ACE2对IBV感染DF-1细胞中JAK2及STAT3磷酸化水平变化

Figure 9 Impact of ACE2 on the phosphorylation of JAK2 and STAT3 in IBV contaminated DF-1 cells. A: Band pattern of ACE2 on the phosphorylation of JAK2 and STAT3 in IBV contaminated DF-1 cells by Western blotting. ImageJ analysis of gray value of the phosphorylation of JAK2 (B) or STAT3 (C). Compared with the Mock group, * indicates a significant difference ($P<0.05$); Compared with the IBV infected group, # indicates a significant difference ($P<0.05$).

mRNA 表达差异无统计学意义, 且表达量明显低于 Vero 细胞, 这种差异性结果推测有可能是因为 Vero 细胞为非洲绿猴肾细胞, 是干扰素缺

陷型细胞系, 干扰素免疫应答不完整, 在反映病毒的复制过程中存在缺陷, 还需要进一步深入研究具体机制。而 DF-1 细胞为鸡胚成纤维细

胞,又属于 IBV 宿主的本体细胞,可以准确地反映病毒的复制过程,因此以上结果提示 ACE2 在 IBV 感染过程中发挥作用,但对该病毒在 DF-1 细胞中的复制无明显影响。

鸡传染性支气管炎是一种高度传染性病毒性疾病,其呼吸道的发病主要是由大量淋巴细胞和异粒细胞的浸润及炎症因子的释放破坏了黏膜组织的完整性。IL-6 是活化 T 细胞和成纤维细胞产生的典型促炎细胞因子^[13]。当体内发生炎症时,IL-6 表达上调,导致血液和淋巴循环中的炎症细胞浸润并积聚在病变组织内或周围,同时释放炎症因子和其他活性产物,从而加剧感染症状并延长病程^[14]。林春发等^[15]发现患鸡传染性支气管炎的雏鸡血清中 IL-6 含量显著升高,白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 含量显著降低。Xin 等^[16]和 Santos 等^[17]证实 IBV 感染雏鸡后,细胞免疫和体液免疫功能处于低下与失衡状态,导致雏鸡 IL-6 等炎症因子大量释放,造成炎症损伤。Chen 等^[18]也证实 IBV 感染原代鸡胚肾(chicken embryo kidney, CEK)细胞导致 IL-6、IL-1 β 水平显著升高。本研究结果显示,IBV 感染 Vero 和 DF-1 细胞,可使细胞中 IL-8、IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平升高,IL-6 水平和 mRNA 表达显著升高,与上述研究者结果一致。过表达 ACE2 后 IL-6 水平和 mRNA 表达显著下调;缺失 ACE2 后 IL-6 水平和 mRNA 表达显著上调,提示 ACE2 可减少 IBV 所致的细胞中 IL-6 等炎症因子的释放,缓解炎症反应,与 Xiang 等^[19]激活巨噬细胞中 ACE2 抑制 IL-6 产生的结果一致。

JAK 是一种重要的酪氨酸蛋白,也是 IL-6/JAK2/STAT3 信号转导途径的中间信号蛋白^[20]。STAT3 与细胞增殖、分化和凋亡密切相关,在免疫反应、炎症反应和其他病理过程中

发挥着重要的调节作用。STAT3 的异常激活有助于许多疾病的发展^[21]。IL-6 是 JAK2/STAT3 信号转导途径的重要启动子,与 IL-6R 受体结合后,可激活细胞膜表面的 gp130,然后将其下游 JAK2 和 STAT3 磷酸化为具有生物活性的 pJAK2 和 pSTAT3^[22]。pSTAT3 进一步激活促炎因子如 IL-6 的表达。同时,激活的 JAK2/STAT3 信号的转导也可以增加炎症细胞因子的分泌,导致 JAK2 的激活,从而以正反馈模式调节 JAK2/STAT3 通路,并促进炎症反应的持续放大。方欢乐等^[23]发现抑制 IL-6 的表达可以下调 JAK2、STAT3 表达。欧更等^[24]表明降低 IL-6 的水平,导致 JAK2、pJAK2 与 STAT3、pSTAT3 蛋白表达下调。沈洪等^[25]证实 IL-6 含量增高引起 pJAK2/JAK2 和 pSTAT3/STAT3 表达均显著增高。本试验同样表明,IBV 感染 Vero、DF-1 细胞后促使 IL-6 mRNA 表达显著上调,进而导致 JAK2、STAT3 蛋白的磷酸化水平显著升高。过表达 ACE2 使 JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平显著下调,表明 IBV 感染后,ACE2 能抑制 IL-6 的 mRNA 表达,降低细胞内 JAK2、STAT3 磷酸化水平从而抑制炎症反应的发生发展。而缺失 ACE2 后 JAK2、STAT3 蛋白磷酸化水平变化不明显,推测缺失 ACE2 后,IL-6 等炎症因子的 mRNA 表达上调,可能还存在其他途径参与该炎症反应。

综上所述,本研究结果表明 ACE2 在 DF-1 细胞中与 IBV 病毒复制无明显相关,但在 IBV 诱导 Vero、DF-1 细胞炎症反应中具有一定的抵抗作用,其机制是通过下调 IL-6 mRNA 表达及 JAK2 和 STAT3 蛋白的磷酸化水平,抑制 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的异常激活,达到抑制炎症因子的释放、缓解炎症损伤的作用。这为 ACE2 作为缓解鸡传染性支气管炎的备用策略提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] MENDOZA-TORRES E, RIQUELME JA, VIELMA A, SAGREDO AR, GABRIELLI L, BRAVO-SAGUA R, JALIL JE, ROTHERMEL BA, SANCHEZ G, OCARANZA MP, LAVANDERO S. Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion injury by angiotensin-(1-9) through an AT2R and Akt-dependent mechanism[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 135: 112-121.
- [2] BAKHLE YS. How ACE inhibitors transformed the renin-angiotensin system[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2020, 177(12): 2657-2665.
- [3] JIALU Q, WEILING L, JIAN B, QIAN P, DONGMEI W, JIANING W, BINLIAN S. The expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and CD147, and protease TMPRSS2 in human and mouse brain cells and mouse brain tissues[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 533(4): 867-871.
- [4] MONTEIL V, KWON H, PRADO P, HAGELKRÜYS A, WIMMER RA, STAHL M, LEOPOLDI A, GARRETA E, HURTADO del POZO C, PROSPER F, ROMERO JP, WIRNSBERGER G, ZHANG HB, SLUTSKY AS, CONDER R, MONTSERRAT N, MIRAZIMI A, PENNINGER JM. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2[J]. *Cell*, 2020, 181(4): 905-913.e7.
- [5] KAI H, KAI M. Interactions of coronaviruses with ACE2, angiotensinII, and RAS inhibitors—lessons from available evidence and insights into COVID-19[J]. *Hypertension Research*, 2020, 43(7): 648-654.
- [6] NII T, ISOBE N, YOSHIMURA Y. Effects of avian infectious bronchitis virus antigen on eggshell formation and immunoreaction in hen oviduct[J]. *Theriogenology*, 2014, 81(8): 1129-1138.
- [7] (SJA) de WIT JJ, COOK JKA, van der HEIJDEN HMJF. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures[J]. *Avian Pathology*, 2011, 40(3): 223-235.
- [8] LIAO Y, WANG XX, HUANG M, TAM JP, LIU DX. Regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase and dual-specificity phosphatase 1 feedback loop modulates the induction of interleukin 6 and 8 in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus[J]. *Virology*, 2011, 420(2): 106-116.
- [9] WANG K, LIU XQ, XIAO H, WANG HH, ZHANG YS. The correlation between inflammatory injury induced by LPS and RAS in Eph4-Ev cells[J]. *International Immunopharmacology*, 2017, 46: 23-30.
- [10] WU J, DENG W, LI SM, YANG XH. Advances in research on ACE2 as a receptor for 2019-nCoV[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(2): 531-544.
- [11] ZHOU P, YANG XL, WANG XG, HU B, ZHANG L, ZHANG W, SI HR, ZHU Y, LI B, HUANG CL, CHEN HD, CHEN J, LUO Y, GUO H, JIANG RD, LIU MQ, CHEN Y, SHEN XR, WANG X, ZHENG XS, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [12] 喻伟艳, 许跃强, 李建军, 李志敏, 王琪, 杜昱光. 新型冠状病毒的糖基化、糖受体识别及糖链抑制剂的发现[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(9): 3157-3172.
- [12] YU WY, XU YQ, LI JJ, LI ZM, WANG Q, DU YG. Glycosylation, glycan receptors recognition of SARS-CoV-2 and discoveries of glycan inhibitors against SARS-CoV-2[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(9): 3157-3172 (in Chinese).
- [13] KAUR S, BANSAL Y, KUMAR R, BANSAL G. A panoramic review of IL-6: structure, pathophysiological roles and inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2020, 28(5): 115327.
- [14] KANG SJ, TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Targeting interleukin-6 signaling in clinic[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 1007-1023.
- [15] 林春发, 罗艺晨, 王忠清, 冯静波, 刘娟. 板芩桔甘合剂对传染性支气管炎病毒人工感染雏鸡的临床疗效分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(2): 382-391.
- [15] LIN CF, LUO YC, WANG ZQ, FENG JB, LIU J. The clinical efficacy of BQJGHJ (a traditional Chinese medicine compound pharmaceuticals) in the treatment of chickens artificially infected with infectious bronchitis virus[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2020, 51(2): 382-391 (in Chinese).
- [16] XIN Y, JIANAN L, HUI L, PENG Z, DANYU C, SHUAI M, XIAOCHENG L, HONGNING W. Induction of innate immune response following introduction of infectious bronchitis virus (IBV) in the trachea and renal tissues of chickens[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 116: 54-61.
- [17] SANTOS FERNANDO F, KASMANAS TC, DINIZ LOPES P, MONTASSIER HJ, ASSAYAG MS Jr. An infectious bronchitis virus mass-like strain from Brazil causing kidney damage and tropism in a broiler flock[J]. *Veterinary Record Case Reports*, 2017, 5(3):

- e000492.
- [18] CHEN HJ, MUHAMMAD I, ZHANG Y, REN YD, ZHANG RL, HUANG XD, DIAO L, LIU HX, LI XL, SUN XQ, ABBAS G, LI GX. Antiviral activity against infectious bronchitis virus and bioactive components of *Hypericum perforatum* L[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1272.
- [19] XIANG Z, LIU JL, SHI DK, CHEN W, LI J, YAN RL, BI YF, HU WG, ZHU ZG, YU YY, YANG ZT. Glucocorticoids improve severe or critical COVID-19 by activating ACE2 and reducing IL-6 levels[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2020, 16(13): 2382-2391.
- [20] BURJA B, MERTELJ T, FRANK-BERTONCELJ M. Hi-JAKi-ng synovial fibroblasts in inflammatory arthritis with JAK inhibitors[J]. *Frontiers in Medicine*, 2020, 7: 124.
- [21] ISOMÄKI P, JUNTILA I, VIDQVIST KL, KORPELA M, SILVENNOINEN O. The activity of JAK-STAT pathways in rheumatoid arthritis: constitutive activation of STAT3 correlates with interleukin 6 levels[J]. *Rheumatology*, 2015, 54(6): 1103-1113.
- [22] WAINSTEIN MV, MOSSMANN M, ARAUJO GN, GONÇALVES SC, GRAVINA GL, SANGALLI M, VEADRIGO F, MATTE R, REICH R, COSTA FG, ANDRADES M, SILVA AMV, BERTOLUCI MC. Elevated serum interleukin-6 is predictive of coronary artery disease in intermediate risk overweight patients referred for coronary angiography[J]. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2017, 9(1): 1-7.
- [23] 方欢乐, 李晓明, 倪敏弢, 赵玉文, 杨永华. PNU282987 对小鼠心脏重塑的改善作用及对 JAK2/STAT3 信号通路的影响[J]. *中国药房*, 2021, 32(10): 1246-1251.
- FANG HL, LI XM, NI MM, ZHAO YW, YANG YH. Effects of PNU282987 on improving cardiac remodeling and JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *China Pharmacy*, 2021, 32(10): 1246-1251 (in Chinese).
- [24] 欧更, 辛昊, 周南. 基于 JAK2-STAT3 信号通路探讨硫酸羟氯喹治疗佐剂性类风湿性关节炎大鼠的作用机制[J]. *解剖科学进展*, 2021, 27(3): 273-276.
- OU G, XIN H, ZHOU N. Based on JAK2-STAT3 signaling pathway to explore the mechanism of hydroxychloroquine sulfate in the treatment of adjuvant rheumatoid arthritis rats[J]. *Progress of Anatomical Sciences*, 2021, 27(3): 273-276 (in Chinese).
- [25] 沈洪, 朱磊, 刘亚军, 张露, 邢敬, 顾培青. 健脾补肾清肠方对溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路的影响[J]. *中医杂志*, 2020, 61(22): 1977-1982.
- SHEN H, ZHU L, LIU YJ, ZHANG L, XING J, GU PQ. Effects of Jianpi Bushen Qingchang formula on IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in colon tissue of ulcerative colitis model rats[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 61(22): 1977-1982 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)