

陈琪敏,周红霞,谢佩芳,等. 基于转录组学探讨阿比朵尔对 HCoV-OC43 感染诱导神经营养因子信号通路活化的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 81-89.

Chen QM, Zhou HX, Xie PF, et al. Transcriptome-based exploration of the effect of Arbidol on HCoV-OC43 infection-induced activation of the neurotrophin signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 81-89.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.011

基于转录组学探讨阿比朵尔对 HCoV-OC43 感染诱导神经营养因子信号通路活化的影响

陈琪敏¹,周红霞²,谢佩芳³,李润峰⁴,杨子峰^{4,5,6,7},邱敏珊²,沈利汉^{1,2*}

(1.广东医科大学,广东 湛江 524023;2.南方医科大学第十附属医院(东莞市人民院),东莞市呼吸和重症医学研究所,重症医学科,广东 东莞 523059;3.昆明理工大学生命科学与技术学院,昆明 650500;4.广州医科大学附属第一医院广州呼吸健康研究院呼吸疾病国家重点实验室/国家呼吸系统疾病临床医学研究中心,广州 510000;5.广州实验室,广州 510000;6.广州市传染性疾病预防快速诊断与预警重点实验室,广州 510000;7.澳门科技大学中药质量研究国家重点实验室,澳门 519020)

【摘要】 目的 采用转录组学技术分析阿比多尔(arbidol, ARB)对 HCoV-OC43 感染引起宿主信号通路活化的影响,并探讨 ARB 抗炎活性与其作用于神经营养因子信号通路的关系。**方法** 用 OC43 感染 HRT-18 细胞,并以 ARB 进行干预。感染 96 h 后提取总 RNA,进行转录组学分析,获得差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),开展基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,筛选出 ARB 可能作用的生物学过程及相关信号通路。进一步利用 RT-qPCR 方法验证 ARB 干预对神经营养因子信号通路关键分子表达的抑制作用。**结果** 与病毒感染组相比,高、中和低剂量(6、2 和 0.67 μg/mL)ARB 干预分别显示出 9459、4186 和 1744 个 DEGs。GO 分析显示,ARB 主要干预的生物学过程是共翻译蛋白膜靶向,作用的细胞组成为粘着斑和细胞-底物间连接,影响的分子功能为钙粘蛋白结合。KEGG 分析发现,与冠状病毒感染相关的细胞凋亡信号通路和神经营养因子信号通路有明显富集,其中 ARB 对神经营养因子信号通路中的 MAPK、PI3K 和 NF-κB 通路分子有显著抑制作用。RT-qPCR 检测显示,ARB 对 *PIK3CA*、*AKT*、*TRAF-6*、*Bax*、*p38* 和 *c-JUN* 等分子的 mRNA 表达具有明显抑制作用。**结论** 本研究提示了 ARB 应用于治疗冠状病毒感染引起神经炎症的可能性。

【关键词】 转录组学;阿比多尔;HCoV-OC43;神经营养因子信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0081-09

Transcriptome-based exploration of the effect of Arbidol on HCoV-OC43 infection-induced activation of the neurotrophin signaling pathway

CHEN Qimin¹, ZHOU Hongxia², XIE Peifang³, LI Runfeng⁴, YANG Zifeng^{4,5,6,7}, QIU Minshan², SHEN Lihan^{1,2*}

(1. Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China. 2. Department of Critical Care Medicine, Dongguan Institute of Respiratory and Critical Care Medicine, the 10th Affiliated Hospital of Southern Medical University

【基金项目】广东省防控新型冠状病毒感染科技攻关应急专项(2020A111129028);东莞市新型冠状病毒肺炎防疫防治技术研究及推广应急攻关专项项目(202071715001114);广东省基础与应用基础研究基金(2020B1515120045);广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515110151);东莞市人民医院院内项目-科研培育项目(K202002);东莞市人民医院院内项目-科研培育项目(K202019)。

【作者简介】陈琪敏(1994—),女,在读硕士研究生,研究方向:重症医学、宿主与病毒相互作用。E-mail:qiminC0704@outlook.com

【通信作者】沈利汉(1977—),男,博士,主任医师,研究方向:重症医学、宿主与病毒相互作用。E-mail:shenlihan@hotmail.com

(Dongguan People's Hospital), Dongguan 523059. 3. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500. 4. State Key Laboratory of Respiratory Disease, National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000. 5. Guangzhou Laboratory, Guangzhou 510000. 6. Guangzhou key laboratory for clinical rapid diagnosis and early warning of infectious diseases, Guangzhou 510000. 7. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau University of Science and Technology, Macau 519020)

【Abstract】 Objective To analyze the influence of arbidol (ARB) on HCoV-OC43-induced activation of host signaling pathways and to explore the correlation between the anti-inflammatory activity of ARB and its effect on the neurotrophin signaling pathway. **Methods** HRT-18 cells were infected with OC43 and treated with ARB. After 96 hours, total RNA was extracted, transcriptomic analysis was performed to identify differentially expressed genes (DEGs), and Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed to identify potential biological processes and signaling pathways related to ARB treatment. RT-qPCR was used to verify the inhibitory effect of ARB on the expression of important molecules in the neurotrophin pathway. **Results** ARB treatment at high, medium, and low doses (6, 2 and 0.67 μg/mL) resulted in 9459, 4186, and 1744 DEGs, respectively, compared with the virus-infected control group. GO analysis showed that ARB mainly affected biological processes of cotranslational protein targeting to membrane, cellular components such as focal adhesion and cell-substrate junction, and molecular functions such as cadherin binding. KEGG analysis showed that apoptosis and neurotrophin signaling pathways related to coronavirus infection were significantly enriched, and ARB had a significant inhibitory effect on MAPK, PI3K, and NF-κB in the neurotrophin signaling pathway. RT-qPCR analysis revealed that ARB significantly inhibited mRNA expression of *PIK3CA*, *AKT*, *TRAF-6*, *Bax*, *p38*, and *c-Jun*. **Conclusions** This study suggests that ARB can be used for treatment of neuroinflammation caused by coronavirus infection.

【Keywords】 transcriptomes; arbidol; HCoV-OC43; neurotrophin signaling pathway
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

冠状病毒 (coronaviruses, CoVs) 为有包膜的单股正链 RNA 病毒, 病毒粒子呈球形, 基因组全长 27~33kb, 是目前已知基因组最大的 RNA 病毒。根据血清及遗传特性可进一步将冠状病毒分为 α、β、γ、δ 四个属, α 和 β 属主要感染人类及哺乳动物^[1-2]。目前发现能够感染人的冠状病毒共有 7 种, HCoV-229E 和 NL6 属于 α 冠状病毒, 而严重急性呼吸窘迫综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS)、中东呼吸综合征冠状病毒 (middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)、新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SARS-CoV-2)、HCoV-HKU1 和 HCoV-OC43 属于 β 冠状病毒。自 2003 年至今, SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 前后引发全球范围内的严重疫情, 死亡率达 10%~38%^[3-4], 而 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 为常见的人冠状病毒, 主要引起轻至中度上呼吸道疾病。迄今为止, 与冠状病毒相关的神经并发症越来越频繁^[1]。许多研究报告了感染患者表现出头痛、呕吐、肌痛、嗅觉丧失甚至更严

重的脑炎和中风的神经症状和并发症^[1-2]。目前国际上批准可紧急用于治疗 SARS-CoV-2 感染药物仅有奈玛特韦片/利托那韦片^[5], 急需储备更多抗病毒药物。

阿比多尔 (arbidol, ARB) 是具有免疫调节作用的核苷类广谱抗病毒药物, 由前苏联药物化学研究中心研制^[6]。该药物在俄罗斯已上市 20 余年, 于 2006 年在中国获准上市, 普遍用于治疗甲乙型流感病毒引起的上呼吸道感染。临床研究结果表明, ARB 治疗可显著提高 COVID-19 患者的病毒核酸转阴率, 并且能够显著缩短病程^[7-8]。研究表明 ARB 可显著抑制 SARS-CoV 在 Vero E6 细胞中的增殖^[9]。本研究组在前期发现, ARB 可显著抑制 HCoV-OC43 在 HRT-18 细胞中的增殖, 以及通过阻断 p38、Erk1/2 和 JNK 等信号通路的激活从而抑制 IL-6、CXCL-8/IL-8、IFN-α 和 CCL-2/MCP-1 等炎症因子的表达^[10]。为进一步明确 ARB 抗 HCoV-OC43 感染的机制, 本研究通过 RNA-Seq 测序和 RT-qPCR 方法进一步揭示 ARB 对神经营养因子通路的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞

人直肠癌细胞 HRT-18 细胞(ATCC, CCL-224)由本实验室保存。

1.1.2 病毒株

HCoV-OC43 毒株由广州医科大学赵金存教授提供。

1.2 主要试剂与仪器

盐酸阿比朵尔片(arbidol hydrochloride tablets, ARB)购自中海石油欧益制药有限公司; ARB 用 DMSO 配制成浓度为 100 mg/mL 的母液, 于 4℃ 保存待用; TRIzol (Ambion/Invitrogen, 美国); RPMI 1640 培养基(Gibco, 美国); 胎牛血清(FBS)(Gibco, 美国); RR036A PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, 日本); AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, 中国)。Illumina NovaSeq 6000 (illumina, 美国); 荧光定量 PCR ABI 7500(ABI, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞和病毒培养

HRT-18 细胞在 RPMI 1640 培养基(含 10% FBS, 1% 双抗)中培养。收集对数生长期的 HRT-18 细胞接种至 6 孔板, 待细胞长至单层, 弃去培养液, 用 PBS 清洗 2 次后, 加入 100 个 TCID₅₀ 的 HCoV-OC43。34℃ 孵育 2 h 后, 弃去上清, PBS 洗涤 2 次后, 弃去未吸附的病毒。分别加入 6 μg/mL (ARB6)、2 μg/mL (ARB2) 和 0.67 μg/mL (ARB067) 的 ARB, 设病毒组(V)和正常组(Ctrl), 置于 34℃、5% CO₂ 条件继续培养 96 h 后, 弃上清, 再加入 1 mL TRIzol。

1.3.2 RNA 制备, 文库构建与 RNA 序列测定

应用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 并检测 RNA 完整性和总量。通过磁性寡糖(dT)珠纯化 mRNA, 随后在 Fragmentation Buffer 中用二价阳离子将得到的 mRNA 随机打断。以片段化的 mRNA 为模版, 随机寡核苷酸为引物, 在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链, 随后用 RNaseH 降解 RNA 链, 并在 DNAPolymerase I 体系下, 以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 用 AMPure XP beads 筛选 370~420 bp 左右的 cDNA, 进行 PCR 扩增并再次

使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 最终获得文库。然后在 illumina NovaSeq 6000 平台上进行测序。

1.3.3 主成分分析(PCA)与差异表达基因聚类分析热图

PCA 采用线性代数的计算方法, 对数以万计的基因变量进行降维及主成分提取。对所有样本的基因表达值(FPKM)进行 PCA 分析。将所有比较组的差异基因取并集之后作为差异基因集。采用主流的层次聚类对基因的 FPKM 值进行聚类分析, 对行(row)进行均一化处理(Z-score)。

1.3.4 基因的差异表达分析

使用 DESeq 2 软件分析病毒感染组与各组样本基因表达情况, 以 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 且多重假设检验校正后的 $P \leq 0.05$ 为条件, 筛选出差异表达基因。

1.3.5 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析

通过 ClusterProfiler(3.8.1)软件实现差异表达基因的 GO 富集分析和 KEGG 通路中差异表达基因的统计富集, GO 富集分析和 KEGG 通路富集以 $\text{padj} < 0.05$ 作为显著性富集的阈值。

1.3.6 冠状病毒感染相关的信号通路中 DEGs 相关网络分析

利用 STRING v10 在线分析平台, 进行蛋白互作网络(PPI)数据分析, 应用 Cytoscape 软件构建蛋白相互作用网络^[11]。通过 Cytoscape 中的插件 CytoHubba 来计算蛋白质节点, 根据 Degree 分值的高低, 确定 PPI 网络中的关键节点, 筛选关键基因。

1.3.7 SYBR Green RT-qPCR 法检测信号通路分子的 mRNA 表达

将氯仿加入 1.3.1 的细胞 TRIzol 混合物, 振荡后以 12 000 r/min、4℃ 离心 15 min。吸取上清, 加入异丙醇, 振荡后以 12 000 r/min、4℃ 离心 15 min。吸弃上清后, 加入 75% 乙醇溶液, 7500 r/min、4℃ 离心 5 min。吸弃上清后, 加入经 DEPC 处理的水。在超微量分光光度计上检测核酸浓度后, 配制 cDNA 逆转录反应体系(含 5×HiScript III qRT SuperMix、RNA 样本以及经 DEPC 处理的水), 用 PCR 仪进行逆转录, 条件为: 37℃, 15 min→85℃, 5 s→16℃, ∞。配制 qPCR 反应体系(含上下游引物、2×SYBR Green Mix 以及经 DEPC 处理的水), 加入 cDNA 样本进行 qPCR 检测, 反应条件为: 95℃, 30 s(预变性)→95℃, 10 s(变性)→60℃, 30 s(退火延伸), 变性及

退火延伸共 40 个循环。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 ARB 干预后对通路分子 mRNA 相对表达量的影响。信号通路分子引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9 对数据进行分析,结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组之间的比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测序数据产出汇总

根据本实验所建立的测序文库,15 个样品的

表 1 信号通路分子的引物序列
Table 1 Primer sequence for the molecules in signaling pathways

分子 Gene	引物 Primer
PIK3CA	5'-GAAGCACCTGAATAGGCAAGTCG-3'
	5'-GAGCATCCATGAAATCTGGTCGC-3'
AKT	5'-TGGACTACCTGCACTCGGAGAA-3'
	5'-GTGCCGCAAAAGGTCTTCATGG-3'
p58	5'-GAGCGTTACCAGAACCTGTCTC-3'
	5'-AGTAACCGCAGTTCTCTGTAGGT-3'
TRAF6	5'-CAATGCCAGCGTCCCTTCCAAA-3'
	5'-CCAAAGGACAGTTCTGGTCATGG-3'
c-Jun	5'-CCTTGAAAGCTCAGAACTCGGAG-3'
	5'-TGCTGCGTTAGCATGAGTTGGC-3'
Bax	5'-TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG-3'
	5'-TGTTGCCACGGCGCAATCATC-3'
GAPDH	5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

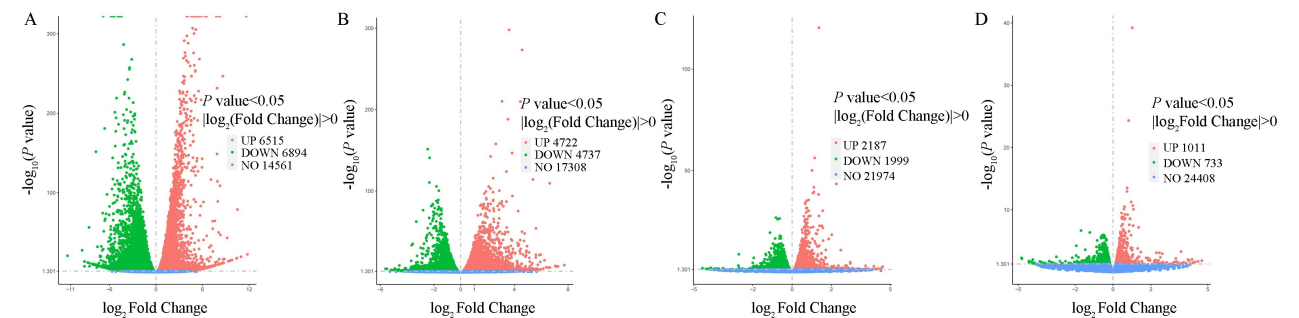
raw reads 在 $4.1\times10^7\sim4.3\times10^7$, 总计为 63.2×10^7 。经过原始数据过滤后,约有 58.9×10^7 (93.2%) 的原始数据作为高质量的读段(clean reads)被保留下来。15 个样品的 reads 差异较小, $Q20\geq96.96$, $Q30\geq92.09$,表明测序结果较好,可用于后续的分析(表 2)。

2.2 mRNA 筛选及差异表达基因分析

使用 DESeq2 软件(1.20.0)进行两个比较组合之间的差异表达分析。使用 Benjamini & Hochberg 的方法来调整所得 P 值, $|\log_2(\text{Fold Change})|\geq1$ & $\text{padj}\leq0.05$ 显著差异表达的阈值。结果显示,与 Ctrl 比较,HCov-OC43 感染组 V 筛选出 13 409 个 DEGs,其中上调和下调的 DEGs 分别为 6515 个和 6894 个(图 1A)。与 V 相比,ARB 的 DEGs 为 9456 个,其中上调和下调的 DEGs 分别为 4722 个和 4737 个(图 1B)。ARB2 的 DEGs 为 4186 个,其中上调和下调的 DEGs 分别为 2187 个和 1999 个(图 1C),ARB067 的 DEGs 为 1744 个,其中上调和下调的 DEGs 分别为 1011 个和 733 个(图 1D)。

2.3 主成分和聚类分析

PCA 的第一个分量(PC1)占总方差的 69.39%,而第二个分量(PC2)收集了 9.56% 的方差(图 2A)。PCA 显示 HCov-OC43 感染组样本与正常对照组样本分散,各处理组组内样本聚集。热图分析显示,V 与 ARB2 和 ARB067 类聚,与 ARB6 组距离较大,表明高剂量 ARB 可能显著影响了病毒感染 HRT-18 细胞引起的基因表达(图 2B)。



注:A:病毒组 vs 正常组;B:ARB6 vs 病毒组;C:ARB2 vs 病毒组;D:ARB067 vs 病毒组。符合 $P\leq0.05$ 和 $|\log_2(\text{Fold Change})|\geq1$ 条件的为表达差异显著的基因;横坐标表示基因的表达倍数变化($\log_2$ Fold Change),纵坐标表示表达差异的显著性水平($-\log_{10}$ Padj);红色和绿色点分别代表上调和下调基因。

图 1 ARB 干预 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞的差异表达基因火山图

Note. A, Virus vs normal control. B, ARB6 vs virus. C, ARB2 vs virus. D, ARB067 vs virus. Significantly differentially expressed genes were defined as having a $P\leq0.05$, $|\log_2(\text{Fold Change})|\geq1$. X axis represents fold changes in gene expression($\log_2$ Fold Change), while Y axis shows significance levels of DEGs. Red and green dots represent up- and down-regulated genes, respectively.

Figure 1 Volcano plots map of DEGs in HCoV-OC43-infected HRT-18 cells treated with ARB

表 2 细胞样本 cDNA 文库测序数据
Table 2 The cDNA sequencing data of cell samples

样本 Samples	原始读数 Raw reads	净读数 Clean reads	净碱基数 Clean bases	错误率(%) Error rate	Q20 值(%) Q20	Q20 值(%) Q30	GC 含量(%) GC content
Ctrl-1	42 168 068	38 650 830	5. 80G	0. 03	97. 15	92. 48	50. 87
ARB6-1	42 542 216	39 046 794	5. 86G	0. 03	97. 08	92. 11	46. 07
ARB2-1	41 454 118	38 884 308	5. 83G	0. 03	97. 03	92. 09	47. 62
ARB067-1	43 745 898	39 994 102	6. 00G	0. 03	97. 17	92. 43	47. 34
V-1	41 336 374	38 015 590	5. 70G	0. 03	97. 09	92. 30	48. 03
Ctrl-2	42 208 406	38 170 680	5. 73G	0. 03	97. 08	92. 28	48. 71
ARB6-2	41 763 494	41 687 318	6. 25G	0. 03	97. 04	92. 13	46. 73
ARB2-2	43 141 988	40 309 962	6. 05G	0. 03	96. 97	92. 10	48. 71
ARB067-2	41 625 968	38 577 392	5. 79G	0. 03	97. 03	92. 19	49. 11
V-2	41 904 598	39 003 642	5. 85G	0. 03	97. 03	92. 14	49. 12
Ctrl-3	41 441 876	38 712 530	5. 81G	0. 03	96. 96	92. 10	50. 87
ARB6-3	41 680 700	38 779 652	5. 82G	0. 03	97. 11	92. 28	48. 19
ARB2-3	42 240 354	39 133 272	5. 87G	0. 03	97. 13	92. 37	48. 54
ARB067-3	41 881 500	39 571 018	5. 94G	0. 03	97. 19	92. 49	48. 24
V-3	43 017 748	40 578 528	6. 09G	0. 03	97. 07	92. 17	48. 60

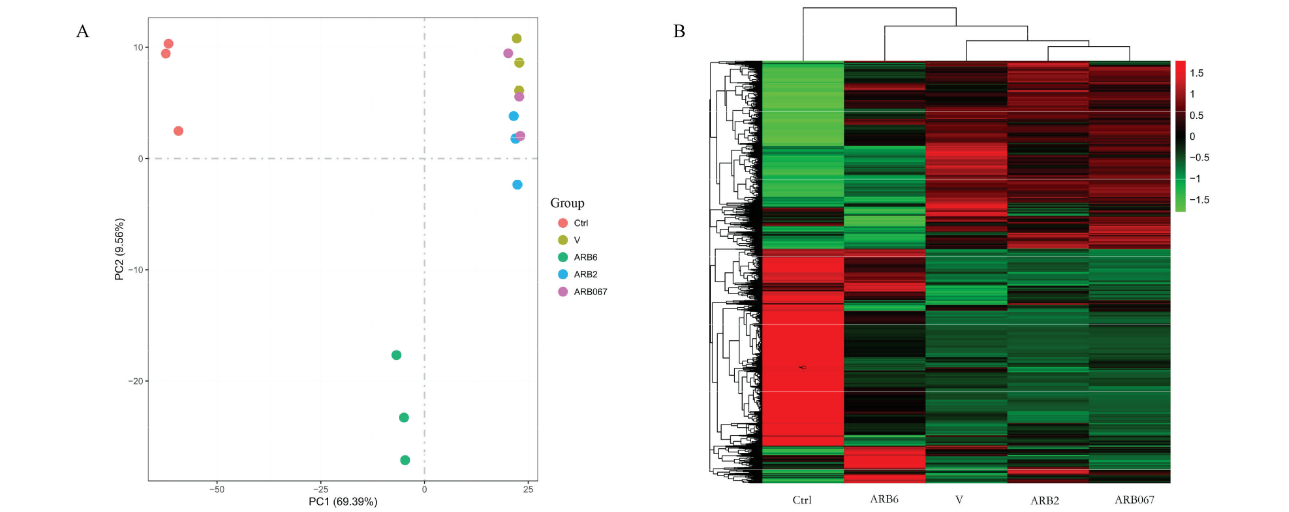


图 2 ARB 干预 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞转录组数据的主成分分析(PCA)与 ARB 干预后差异表达基因的聚类分析
Figure 2 PCA of RNA-seq data from HCoV-OC43-infected HRT-18 cells with ARB treatment and Cluster analysis of DEGs regulated by ARB treatment

2.4 差异表达基因 GO 和 KEGG 富集分析

为探索 ARB 干预 HCoV-OC43 感染细胞的可能机制,进一步对 ARB6 的 9456 个 DEGs 进行 GO 和 KEGG 注释。结果表明,DEGs 显著富集到 237 条 GO 条目($P<0.05$) (图 3A)。ARB 主要干预的生物学过程是共翻译蛋白膜靶向,作用的细胞组成为粘着斑和细胞-底物间连接,影响的分子功能为钙粘蛋白结合。

因冠状病毒感染可激活多种细胞信号通路从而引起过度的炎症反应,抑制这些通路的活化

可起到缓解疾病进程的作用。本研究关注 ARB 干预后显著下调的信号通路。KEGG 结果显示,ARB 干预后出现下调的 DEGs 显著富集在 49 条通路上。在排名前 5 的通路中,细胞凋亡信号通路和神经营养因子信号通路与冠状病毒感染相关(图 3B)。

2.5 DEGs 相关网络分析与关键基因的筛选

利用 STRING(v11.5)分析冠状病毒感染相关的神经营养因子信号通路和细胞凋亡信号通路中 DEGs 蛋白相互作用(PPI)网络。如图 4 所示,与

HCoV-OC43 感染组相比,在经过 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ARB 干预组 (ARB6) 有 42 个 DEGs 下调, PPI 网络共涉及 42 个节点和 209 个边缘。选用 Cytoscape, 根据 Degree 计算确定了 PPI 网络中的 10 个关键基因, 即 AKT1/AKT、JUN/c-JUN、PIK3CA、TRAF-6、MAPK14/p38、RAF1、IKBKB、CRK、CRKL 和 RELA。结合 RNA-Seq 结果, 选取表达量较高的 AKT1/AKT、JUN/c-JUN、PIK3CA、TRAF6 和 MAPK14/p38 等 5 个基因进行验证。由于 Bax 是 Bcl-2 家族中的

重要促凋亡蛋白, 被认为是脑损伤发生的标志物, 因此也选取 Bax 基因进行验证。

2.6 ARB 对神经营养因子信号通路的抑制作用

进一步利用 RT-qPCR 法进行验证, 发现 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ARB 对 PIK3CA、AKT、TRAF-6 和 Bax 的 mRNA 表达具有显著抑制作用 (图 5A、5B、5D、5F)。此外, ARB 也可显著抑制 p38 (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 c-JUN (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 0.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 mRNA 表达 (图 5C、5E)。

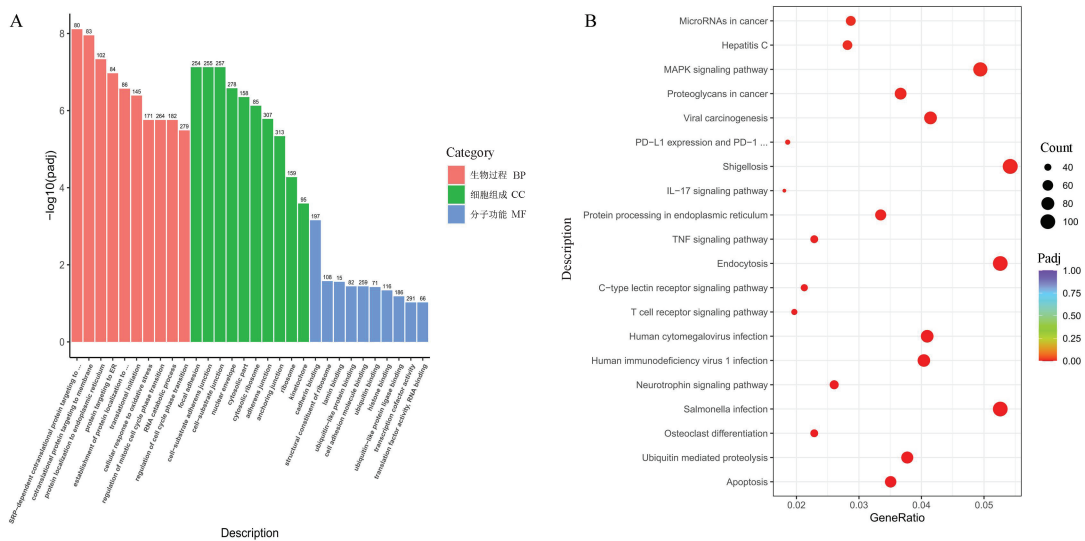
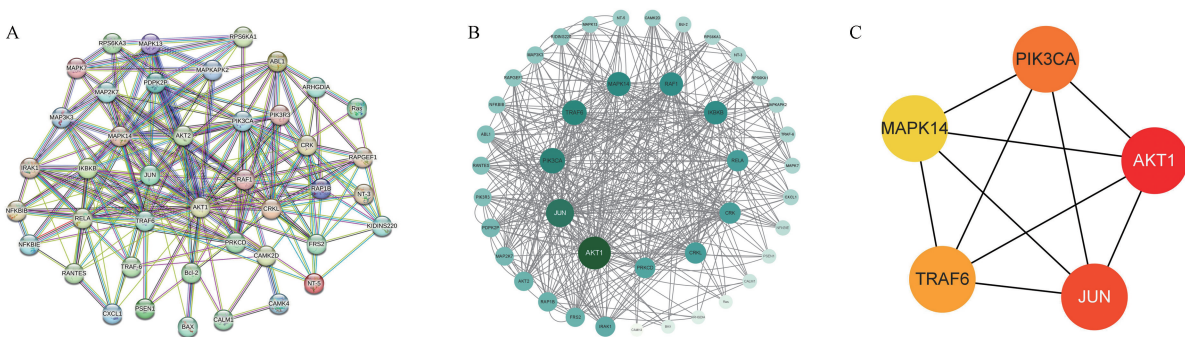


图 3 ARB 干预后差异表达基因的 GO 富集分析与引起信号通路下调表达的 KEGG 富集分析
Figure 3 GO enrichment of DEGs and KEGG enrichment of downregulated pathways regulated by ARB treatment

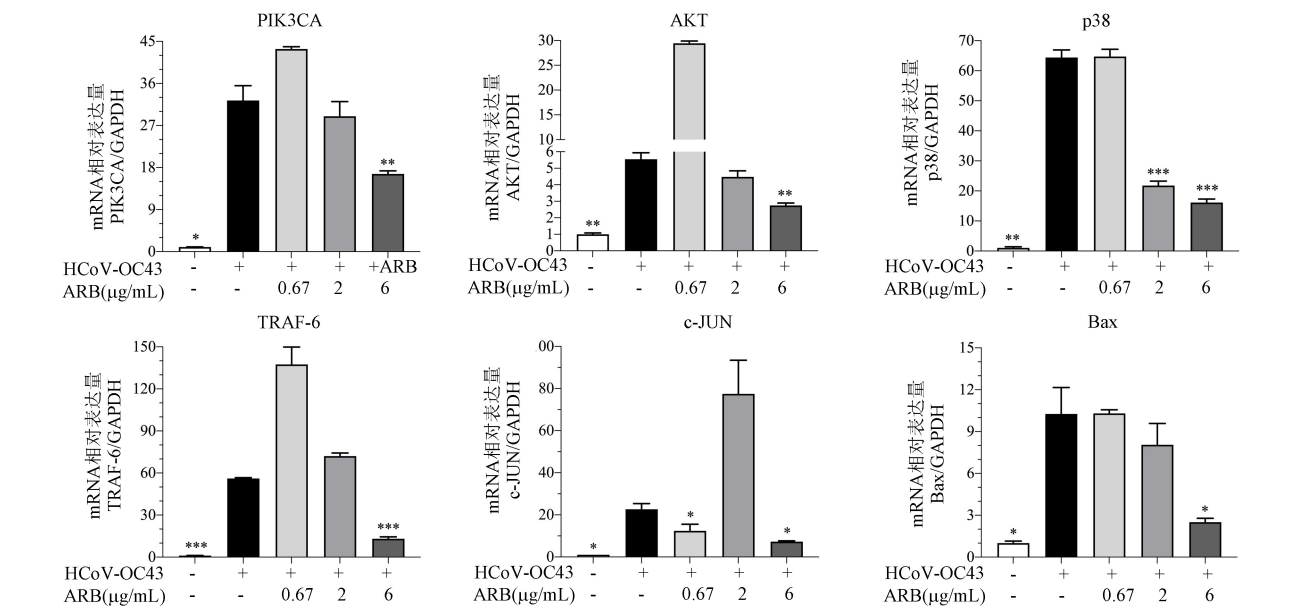


注:A;STRING 网络分析(差异表达基因构建的蛋白质-蛋白质相互作用网络);B;ARB 干预 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞的差异表达基因互作网络,根据“Degree”进行着色,颜色越深表示 Degree 越高;C:关键基因相互作用网络。

图 4 ARB 干预 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞的差异表达基因互作网络

Note. A, STRING network analysis. B, Interaction network of DEGs in HCoV-OC43-infected HRT-18 cells with ARB treatment. The network was colored according to the level of Degree value. The higher the Degree value, the darker the color. C, Interaction network of key genes.

Figure 4 Interaction networks of DEGs in HCoV-OC43-infected HRT-18 cells with ARB treatment



注:以 GAPDH 作为内参,细胞 mRNA 标准化为 1.0,与 HCoV-OC43 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 5 RT-qPCR 检测 ARB 对神经营养因子通路分子 mRNA 表达的影响

Note. Normalized with GAPDH, the cellular mRNA standardization was 1.0. Compared with HCoV-OC43 group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 Effects of ARB treatment on mRNA expressions of molecules in neurotrophin pathway were detected by RT-qPCR assay

3 讨论

HCoV-OC43 是一种嗜神经呼吸道病毒。硬化症患者尸检发现 OC43 在脑部的核酸阳性率达 23%^[12];研究者也曾从脑脊髓炎儿童患者的脑脊液中分离获得 OC43^[12];利用 OC43 滴鼻感染小鼠后发现病毒可经嗅球达到中枢神经系统 (central nervous system, CNS)^[13]。

神经营养因子如神经生长因子 (NGF)、脑源性神经营养因子 (BDNF) 和神经营养因子 3 (NT-3)、NT-4 和 NT-5,是参与 CNS 功能的重要蛋白^[14]。这些神经营养因子进一步被相关受体识别,如原肌球蛋白受体激酶 (Trk) 和 75 kDa NT 受体 (p75NTR) 从而激活下游炎症信号通路。这些通路的适当活化有助于大脑正常发育、神经元存活和突触可塑性^[14]。然而,神经营养因子的作用会因病毒 (如 HIV 和 HSV) 感染而发生改变。目前在冠状病毒感染方面尚缺乏关于神经营养因子作用与 CNS 疾病转归的报道^[14]。有限研究发现, SARS-CoV-2 通过抑制 ACE-2 从而抑制下游 BDNF 的表达^[15]。BDNF 的下调可引发 COVID-19 的神经退化性疾病 (如加剧氧化应激、神经炎症和细胞凋亡)^[15]。根据本研究转录组分析结果,发现 HCoV-OC43 感染 HRT-18 细胞后, BDNF 和 NT-4 分别出现 6.5 倍和 5.2 倍的下调表达, 6 μg/mL 的 ARB 干预可将上述两个因子分别上调 3.4 倍和 2.0 倍。有研究报道, 补充外源性 BDNF 可在小神经胶质细胞中抑制 COX-2 以及上调红细胞生成素 (EPO) 和音猬因子 (Shh), 从而抑制促炎因子的表达^[16]。结合前期我们明确 ARB 对炎症因子具有抑制活性的发现, 其抗炎效应可能与上调 BDNF 的作用相关。HCoV-OC43 抑制神经营养因子表达的机制以及 ARB 干预对上述因子蛋白表达水平的影响均有待进一步研究和确认。

在正常情况下, CNS 的免疫激活主要是响应病毒入侵并产生有利于恢复机体平衡的自限性炎症反应。然而, 过度的炎症可导致神经系统产生炎症介质, 从而导致组织损伤的进一步加剧。神经炎症是冠状病毒感染的特征性致病机制之一。在 SARS-CoV-2 感染中, 神经炎症通常伴随 CNS 损伤, 可由病毒直接侵入 CNS 或间接引起全身过度炎症而引发, 后者的致病机制为 SARS-CoV-2 感染导致固有免疫反应过度激活, 是 COVID-19 的重要标志^[17]。神经营养因子信号通路可激活多个炎症信号级联反应, 包括 MAPK/Erk、MAPK/p38、MAPK/JNK、PLC-γ、PI3K/Akt 和 NF-κB 等通路^[18-19]。PI3K/Akt 级联在小胶质细胞功能中发挥重要作用。已证实, 相比 NF-κB, LPS 优先激活小胶质细胞中的 PI3K/Akt, 可见 PI3K/Akt 在 NF-κB 依赖性炎症反应中起

分子开关作用^[20]。此外,阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可显著抑制 MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 的复制^[21-22]。因此,我们推测 ARB 通过阻断 PI3K/Akt 信号通路从而发挥对冠状病毒的抗病毒和抗炎作用。p38 激酶与多种神经系统疾病有关,尤其是与神经炎症反应有关,可通过激活毒性信号传导加剧疾病进展^[23],主要是因为 p38 在免疫细胞(包括小神经胶质细胞)的炎症因子产生和释放中发挥重要作用^[23]。有报道发现,在脑组织缺血性条件下抑制 p38 α 和 p38 β 可降低神经炎症和细胞因子释放^[24-26];敲除小胶质细胞的 p38 α 在小鼠中可保护 LPS 诱导的神经炎症,降低小胶质细胞的激活、外周炎症细胞的流入、突触丧失并改善运动障碍^[27-28]。本研究 RNA-Seq 数据结果与 qPCR 验证结果明确了 ARB 干预可有效抑制 p38 的 mRNA 表达,与我们前期在蛋白水平的发现一致^[10]。另外,已证实 TRAF-6/JNK/p38-ATF2 轴可促进小胶质细胞的炎症的激活,从而加重脑神经元损伤^[29],这可能成为潜在的治疗靶点^[29]。因此,ARB 对炎症因子的抑制作用可能与阻断 p38 和 TRAF-6 的活化相关。

Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中的抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白,被认为是脑损伤发生的标志物。本研究发现 6 $\mu\text{g/mL}$ 的 ARB 可升高 Bcl-2 与 Bax 的 FPKM 比值($V_{\text{Bcl-2/Bax}}$: 1.54, $\text{ARB6}_{\text{Bcl-2/Bax}}$: 3.84),与 RNA-Seq 数据一致,qPCR 验证结果表明 ARB 可显著抑制 Bax 的 mRNA 表达,提示了 ARB 可能在 OC43 感染中具有抗凋亡作用。此外,凋亡可引发炎症反应,如 TNF 受体依赖的凋亡反应,可促进一系列促炎细胞因子和趋化因子的分泌^[30]。Fas 参与的凋亡反应可招募多种相似的分子,如 FADD、RIPK1 和 IKK 复合物,从而诱导促炎细胞因子和趋化因子(如 IL-6、IL-8、CXCL1 和 RANTES)的产生^[31]。可见,ARB 对细胞因子的抑制作用也可能通过抑制凋亡反应而实现。

综上,本研究提示了阿比朵尔应用于治疗冠状病毒感染引起的神经炎症的可能性。ARB 抗 HoV-OC43 感染的可能机制为抑制神经营养因子信号通路的激活,有待进一步在神经元细胞和神经胶质细胞以及在 OC43 感染小鼠致脑炎的模式中进行验证。

参考文献:

[1] Alshebri MS, Alshoumi RA, Alhumidi HA, et al. Neurological complications of SARS-CoV, MERS-CoV, and COVID-19 [J].

SN Compr Clin Med, 2020, 2(11): 2037-2047.

- [2] Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China [J]. JAMA, 2020, 323(11): 1061-1069.
- [3] Chen J, Subbarao K. The immunobiology of SARS [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25: 443-472.
- [4] Yu X, Zhang S, Jiang L, et al. Structural basis for the neutralization of MERS-CoV by a human monoclonal antibody MERS-27 [J]. Sci Rep, 2015, 5: 13133.
- [5] Wang J, Li H. Editorial of special column on antiviral drug discovery and pharmacology [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(4): 1540-1541.
- [6] Blaising J, Polyak SJ, Pécheur EI. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update [J]. Antiviral Res, 2014, 107: 84-94.
- [7] 李赞, 晋月萍, 葛庆岗, 等. 阿比多尔治疗新型冠状病毒肺炎的有效性和安全性——基于目前与既往抗病毒治疗的系统评价 [J]. 药物不良反应杂志, 2020, 22(6): 333-342.
- [8] Wei S, Xu S, Pan YH. Efficacy of arbidol in COVID-19 patients: a retrospective study [J]. World J Clin Cases, 2021, 9(25): 7350-7357.
- [9] Khamitov RA, Loginova SIA, Shchukina VN, et al. Antiviral activity of arbidol and its derivatives against the pathogen of severe acute respiratory syndrome in the cell cultures [J]. Vopr Virusol, 2008, 53(4): 9-13.
- [10] Xie P, Fang Y, Shen Z, et al. Broad antiviral and anti-inflammatory activity of Qingwenjiere mixture against SARS-CoV-2 and other human coronavirus infections [J]. Phytomedicine, 2021, 93: 153808.
- [11] 刘小花, 徐鹏, 张昕薇, 等. 猪圆环病毒 2 型感染人源细胞的转录组分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 17-24.
- [12] Yeh EA, Collins A, Cohen ME, et al. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis [J]. Pediatrics, 2004, 113(1): e73-e76.
- [13] St-Jean JR, Jacomy H, Desforges M, et al. Human respiratory coronavirus OC43: genetic stability and neuroinvasion [J]. J Virol, 2004, 78(16): 8824-8834.
- [14] Bohmwald K, Andrade CA, Mora VP, et al. Neurotrophin signaling impairment by viral infections in the central nervous system [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5817.
- [15] Motaghinejad M, Gholami M. Possible neurological and mental outcomes of COVID-19 infection: a hypothetical role of ACE-2/Mas/BDNF signaling pathway [J]. Int J Prev Med, 2020, 11: 84.
- [16] Lai SW, Chen JH, Lin HY, et al. Regulatory effects of neuroinflammatory responses through brain-derived neurotrophic factor signaling in microglial cells [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(9): 7487-7499.
- [17] Tavčar P, Potokar M, Kolenc M, et al. Neurotropic viruses, astrocytes, and COVID-19 [J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15: 662578.

- [18] Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, et al. Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders; focus on neuroinflammation [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(5): 3295–3312.
- [19] Cianciulli A, Porro C, Calvello R, et al. Microglia mediated neuroinflammation; focus on PI3K modulation [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 137.
- [20] Saponaro C, Cianciulli A, Calvello R, et al. The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(5): 858–865.
- [21] Basile MS, Cavalli E, McCubrey J, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway: a potential pharmacological target in COVID-19 [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(3): 848–856.
- [22] Kindrachuk J, Ork B, Hart BJ, et al. Antiviral potential of ERK/MAPK and PI3K/AKT/mTOR signaling modulation for Middle East respiratory syndrome coronavirus infection as identified by temporal kinome analysis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(2): 1088–1099.
- [23] Asih PR, Prikas E, Stefanoska K, et al. Functions of p38 MAP kinases in the central nervous system [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 570586.
- [24] Barone FC, Irving EA, Ray AM, et al. SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 296(2): 312–321.
- [25] Piao CS, Che Y, Han PL, et al. Delayed and differential induction of p38 MAPK isoforms in microglia and astrocytes in the brain after transient global ischemia [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002, 107(2): 137–144.
- [26] Sanchez A, Tripathy D, Yin X, et al. p38 MAPK: a mediator of hypoxia-induced cerebrovascular inflammation [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 32(3): 587–597.
- [27] Bachstetter AD, Rowe RK, Kaneko M, et al. The p38 α MAPK regulates microglial responsiveness to diffuse traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(14): 6143–6153.
- [28] Morganti JM, Goulding DS, van Eldik LJ. Deletion of p38 α MAPK in microglia blunts trauma-induced inflammatory responses in mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 98.
- [29] Li M, Zhang D, Ge X, et al. TRAF6-p38/JNK-ATF2 axis promotes microglial inflammatory activation [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 376(2): 133–148.
- [30] Kearney CJ, Sheridan C, Cullen SP, et al. Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) and their antagonists regulate spontaneous and tumor necrosis factor (TNF)-induced proinflammatory cytokine and chemokine production [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(7): 4878–4890.
- [31] Cullen SP, Henry CM, Kearney CJ, et al. Fas/CD95-induced chemokines can serve as “find-me” signals for apoptotic cells [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(6): 1034–1048.

[收稿日期]2022-08-26