

SARS-CoV-2 S1 蛋白通过 ATP/P2Y₂ 和 ERK1/2 信号通路引起呼吸道上皮细胞 IL-6 和 IL-8 分泌

刘兴健¹, 方晓敏¹, 郭羽玲², 张锐钢^{1*} (广东医科大学 1. 基础医学院生理学教研室; 2. 第一临床医学院, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 探究严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2) S1 蛋白诱导呼吸道上皮细胞炎症反应机制以及嘌呤能受体 (P2Y₂) 参与 S1 蛋白引起的炎症反应。**方法** 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 测量 S1 蛋白和/或单克隆抗体 (MAb) 刺激的 16HBE14o- 细胞培养上清中白介素-6 (IL-6)、白介素-8 (IL-8) 和腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 水平, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测血红素氧合酶 1 (HO-1)、双特异性磷酸酶 1 (MKP-1) 和 P2Y₂ mRNA 的转录水平; 小干扰 RNA (siRNA) 敲低 P2Y₂ 表达后, ELISA 检测 S1 蛋白刺激的 16HBE14o- 细胞培养上清中 IL-6 和 IL-8 水平。**结果** S1 蛋白和 MAb 对细胞活力无显著影响 ($P>0.05$)。S1 蛋白刺激 16HBE14o- 细胞引起 IL-6 和 IL-8 分泌增加, 上调 HO-1、MKP-1 和 P2Y₂ mRNA 表达, 增加了胞外 ATP 水平 ($P<0.001$ 或 0.01), MAb 显著抑制了 S1 蛋白引起的 IL-6 和 IL-8 分泌 ($P<0.001$ 或 0.01)。siRNA 敲低 P2Y₂ 的表达能够显著降低 S1 蛋白诱导的 IL-6 和 IL-8 分泌, 同时 ERK1/2 抑制剂 PD98059 也抑制了 S1 蛋白引起的 IL-6 和 IL-8 分泌 ($P<0.001$)。**结论** SARS-CoV-2 S1 蛋白能够通过 ATP/P2Y₂ 和 ERK 信号通路诱导呼吸道上皮细胞发生炎症反应。

关键词: SARS-CoV-2 S1 蛋白; 胞外 ATP; ERK1/2; 支气管上皮细胞; 炎症

中图分类号: R 181.3+2; R 511 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-3610 (2024) 04-0337-09

SARS-CoV-2 spike S1 protein promotes IL-6 and IL-8 release via ATP/P2Y₂ and ERK1/2 signaling pathways in human bronchial epithelial cells

LIU Xing-jian¹, FANG Xiao-min¹, GUO Yu-ling², ZHANG Rui-gang^{1*} (1. Department of Physiology, Basic Medical School, Guangdong Medical University; 2. First Clinical School, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanisms by which SARS-CoV-2 S1 protein induce pro-inflammatory responses in human bronchial epithelial cells and purinergic receptors were involved in the inflammatory by the S1 protein stimulation. **Methods** The pro-inflammatory cytokine (interleukin-6) IL-6 and (interleukin-8) IL-8 secretion and adenosine triphosphate (ATP) level in 16HBE14o- cells induced by S1 protein and/or monoclonal antibody (MAb) were determined by using Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The (Heme Oxygenase-1) HO-1, (dual specificity phosphatases-1) MKP-1 and P2Y₂ mRNA expression in 16HBE14o- cells after S1 protein stimulation were determined by Real-time quantitative fluorescence PCR (qRT-PCR). Small interfering RNA (siRNA) knockdown P2Y₂ expression ELISA detected the IL-6 and IL-8 release in 16HBE14o- cells after S1 protein stimulation. **Results** S1 protein and MAb had no significant effects on cell viability ($P>0.05$). S1 protein induced IL-6 and IL-8 secretion, regulated HO-1, MKP-1, and P2Y₂ mRNA expression, and increased extracellular ATP levels in 16HBE14o- cells ($P<0.001$ or 0.01). The MAb significantly inhibited the secretion of IL-6 and IL-8 induced by S1 protein ($P<0.001$ or 0.01). siRNA knockdown of P2Y₂ expression significantly reduced S1 protein-induced IL-6 and IL-8 secretion, while ERK1/2 inhibitor PD98059 also inhibited S1 protein-induced IL-6 and IL-8 secretion ($P<0.001$). **Conclusion** SARS-CoV-2 S1 protein induce inflammatory responses in respiratory epithelial cells through the ATP/P2Y₂ and ERK signaling pathways.

Key words: SARS-CoV-2 S1 protein; extracellular ATP; ERK1/2; bronchial epithelial cells; inflammation

收稿日期: 2024-04-19

基金项目: 国家自然科学基金 (82000008)

作者简介: 刘兴健, 男, 在读硕士研究生, E-mail: 1173327457@qq.com

通信作者: 张锐钢, 男, 博士, 讲师, E-mail: zrg2501@sina.com

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是由SARS-CoV-2引起的全球性传染病,其传播速度快、影响范围广,对人类健康构成了巨大威胁,全球公共卫生体系受到前所未有的挑战。SARS-CoV-2是一种单链RNA病毒,S蛋白是SARS-CoV-2的主要抗原,包含两个功能性亚基蛋白(S1蛋白和S2蛋白)。其中S1蛋白含有受体结合结构域(RBD),负责与血管紧张素转换酶2(ACE2)结合,而S2蛋白则负责将S蛋白锚定在细胞膜上,并促进病毒与宿主细胞膜的融合^[1]。

研究发现,S蛋白诱导的细胞因子产生与核因子- κ B(NF- κ B)和蛋白-1(AP-1)信号通路的激活有关^[2-3]。这些炎症信号通路的激活或失调可能导致细胞因子风暴,这在COVID-19患者的血清和支气管肺泡灌洗液中得到了证实^[4-5]。S蛋白是SARS-CoV-2的主要结构蛋白,能够在多种细胞类型中诱导炎性细胞因子和趋化因子的表达,如IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等^[6-8]。此外,S蛋白还能够引起细胞自噬和凋亡,进而加剧炎症反应^[9-10]。然而,关于S蛋白如何独立于病毒在呼吸道上皮细胞中引发炎症反应的具体机制目前尚不完全清楚。SARS-CoV-2 Omicron变异株B.1.1.529自发现以来,因其传播速度快、免疫逃逸能力较强而备受关注。BA.2.12.1是Omicron的一个分支,其在传播速度和免疫逃逸能力方面较Omicron有所增强。因此,本研究选择B.1.1.529和BA.2.12.1作为实验对象,为了解这一变异株的传播能力及免疫逃逸机制,以探究S1蛋白诱导呼吸道炎症机制。

三磷酸腺苷(ATP)不仅是细胞内的能量载体,而且在人体生理学和病理学中扮演着核心角色。细胞外ATP与嘌呤能受体P2XR和P2YR的结合,被认为是引发炎症的关键因素^[11-12]。在正常生理状态下,由于外核苷酸酶的调节,细胞外ATP的浓度保持在较低水平。然而,在感染或炎症条件下,细胞外ATP的浓度会显著增加^[13]。ATP在调节人气管上皮功能方面起着重要作用,临床研究表明,嘌呤能受体激动剂可以增强黏膜纤毛的清除能力^[14]。在慢性阻塞性肺疾病(COPD)患者的气道中,急性烟雾暴露会导致支气管内ATP浓度升高,这表明细胞外ATP可能通过促进炎症和组织降解来加速COPD的发展^[15]。因此,本研究的目的是深入探究S1蛋白如何独立于病毒诱导呼吸道上皮细胞炎症反应的机制,并明确嘌呤能受体在S1蛋白引发的炎症反应中的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

人呼吸道支气管上皮细胞系(16HBE14o-)细胞

培养所需试剂如胎牛血清、MEM基础培养基、青霉素等购自Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)和Hyclone(泰勒,中国广州),ERK1/2抑制剂PD98059购自GLP-BIO(Montclair, CA, USA)。SARS-CoV-2 B.1.1.529 Spike S1蛋白(Omicron, Catalog: 40591-V08H41), SARS-CoV-2 BA.2.12.1 Spike S1蛋白(Omicron, Catalog: 40591-V08H45)和SARS-CoV-2 Spike Antibody(Omicron Reactive, Monoclonal antibody, Catalog: 40592-MM117)购自Sino Biological。

1.2 细胞培养

按照参考文献提供的方法培养16HBE14o-细胞^[16]。将获得的16HBE14o-细胞于37℃、5%CO₂、80%湿度的细胞培养箱中培养。待细胞长满后,用细胞消化液消化传代并接种于96孔板、24孔板或6孔板中;当细胞长满后添加无血清培养基过夜处理,之后施加药物。抑制剂等药物提前1h添加,随后S1蛋白和/或单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb)刺激细胞6、18h;Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测细胞活力,实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测mRNA的表达情况,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测细胞培养上清中细胞因子[白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)]的分泌。

1.3 ELISA

收集细胞培养物上清,使用市售的ELISA试剂盒分析ATP(酶联,中国上海)、IL-6(Invitrogen Biosciences, Carlsbad, CA, USA)和IL-8(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)。每个样品设置2个复孔,实验分别独立重复至少3次,然后通过标准曲线计算浓度。

1.4 RT-PCR

1.4.1 RNA提取 使用细胞/细菌总RNA提取试剂盒(TIANGEN, 北京),按照试剂盒说明提取16HBE14o-总RNA, nanodrop测量RNA浓度和纯度。

1.4.2 反转录反应 用RT试剂盒(Bio-Rad)将总RNA逆转录为cDNA,严格按照说明书进行操作,整个过程均在冰上进行。逆转录反应体系,总体积20 μ L,即4 μ L的5 $\times$ Reverse Transcription预混液,1 μ L的PrimeScript反转录酶,1 μ g RNA样品,加入ddH₂O使总体积为20 μ L,反应条件:25℃ 5 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。

1.4.3 qRT-PCR反应 qRT-PCR反应在96孔板中进行,反应体系为10 μ L的SYBR®Green Realtime PCR MasterMix,上、下游引物各0.5 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 8 μ L,共计20 μ L。95℃预变性60 s后进行PCR反应,

95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 45 个循环, 在荧光定量 PCR 仪 (QuantStudio1, 美国 Applied Biosystems 公司) 中进行 qRT-PCR 反应, 反应结束后计算各反应孔中的 Ct 值。通过 GAPDH 标准化, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量血红素氧合酶 1 (HO-1)、双特异性磷酸酶 1 (MKP-1) 和 P2Y₂ mRNA 表达, 引物序列如表 1 所示。

1.5 小干扰 RNA (siRNA) 转染

将常规培养的 16HBE14o- 细胞接种于 6 孔板和 24 孔细胞培养板, 当细胞达到 60%~70% 后, 将培养基改为 Opti-MEMTM 减血清培养基 (Gibco, Invitrogen, USA)。将 P2Y₂ siRNA 或 control siRNA (吉玛基因, 中国苏州) 和 Lipofectamine®RNAiMAX 试剂 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 转染。使用 Opti-MEMTM 稀释 siRNA 得到 siRNA 预混液, 随后使用 Opti-MEMTM 稀释 Lipofectamine®RNAiMAX 得到 Lipofectamine®RNAiMAX 转染预混液, 将稀释的 siRNA 预混液缓慢加入到 Lipofectamine®RNAiMAX 转染试剂中混匀 (体积比 1:1) 室温孵育 5 min, 将 50 μ L 的 siRNA-Lipofectamine®RNAiMAX 复合物加入 24 孔细胞培养板, 将 250 μ L 的 siRNA-Lipofectamine®RNAiMAX 复合物加入 6 孔细胞培养板, 前后移动培养板混合均匀, 转染 24 h 后进行后续实验。

1.6 Western blot

用 Western/IP 裂解缓冲液裂解细胞, 提取总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 分离蛋白, 然后将胶转移至 PVDF 膜; 用 5% 脱脂牛奶封闭液室温封闭 1 h, 洗涤后按比例稀释双标一抗 P2Y₂ (Bioss, 中国北京) 和 GAPDH (Cell Signaling Technology, USA), 4 °C 孵育过夜, 洗涤后将 PVDF 膜与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h; 洗涤后将化学发光底物加于 PVDF 膜上, X 射线胶片曝光、扫描。以 GAPDH 作为内参, 用 Image J 软件定量分析。

1.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行统计学分析。

数据采用夏皮洛-威尔克检验 (Shapiro-Wilk) 方法进行正态分布检验, 绝对值检验 (Brown-Forsythe test) 进行方差齐性分析。符合正态分布且方差齐性的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用两独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两比较采用 Šidák's 检验。若符合正态分布但方差不齐则采用 Welch 单因素方差分析 (Welch's ANOVA)。计数资料以频数和百分比表示, 检验水准 $\alpha=0.05$ (双尾)。样本均一式两份, 除非另有说明, 否则所有实验至少独立重复 3 次。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SARS-CoV-2 Omicron 变异株 S1 蛋白诱导 16HBE14o- 细胞中 IL-6 和 IL-8 分泌

CCK-8 结果表明 S1 蛋白和 MAb 均未对细胞活力产生显著影响 ($P>0.05$), 见图 1A、B。B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白处理 6 h 和 18 h, IL-6 (6 h B.1.1.529: $t=6.084$, $P<0.001$; 6 h BA.2.12.1: $t=8.592$, $P<0.001$; 18 h B.1.1.529: $t=8.208$, $P<0.001$; 18 h BA.2.12.1: $t=8.801$, $P<0.001$) 和 IL-8 (6 h B.1.1.529: $t=4.261$, $P<0.01$; 6 h BA.2.12.1: $t=3.828$, $P<0.001$; 18 h B.1.1.529: $t=6.306$, $P<0.001$; 18 h BA.2.12.1: $t=8.109$, $P<0.001$) 水平均明显增加, 见图 1C~F。而 MAb 的存在则显著抑制了 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白诱导的 IL-6 (6 h B.1.1.529: $t=9.505$, $P<0.001$; 6 h BA.2.12.1: $t=6.224$, $P<0.001$; 18 h B.1.1.529: $t=7.112$, $P<0.001$; 18 h BA.2.12.1: $t=11.42$, $P<0.001$) 和 IL-8 (6 h B.1.1.529: $t=3.103$, $P<0.01$; 6 h BA.2.12.1: $t=5.283$, $P<0.001$; 18 h B.1.1.529: $t=6.475$, $P<0.001$; 18 h BA.2.12.1: $t=7.612$, $P<0.001$) 的分泌。

2.2 SARS-CoV-2 Omicron 变异株 S1 蛋白刺激 16HBE14o- 细胞上调 HO-1 和 MKP-1 mRNA 的表达

使用 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白刺激

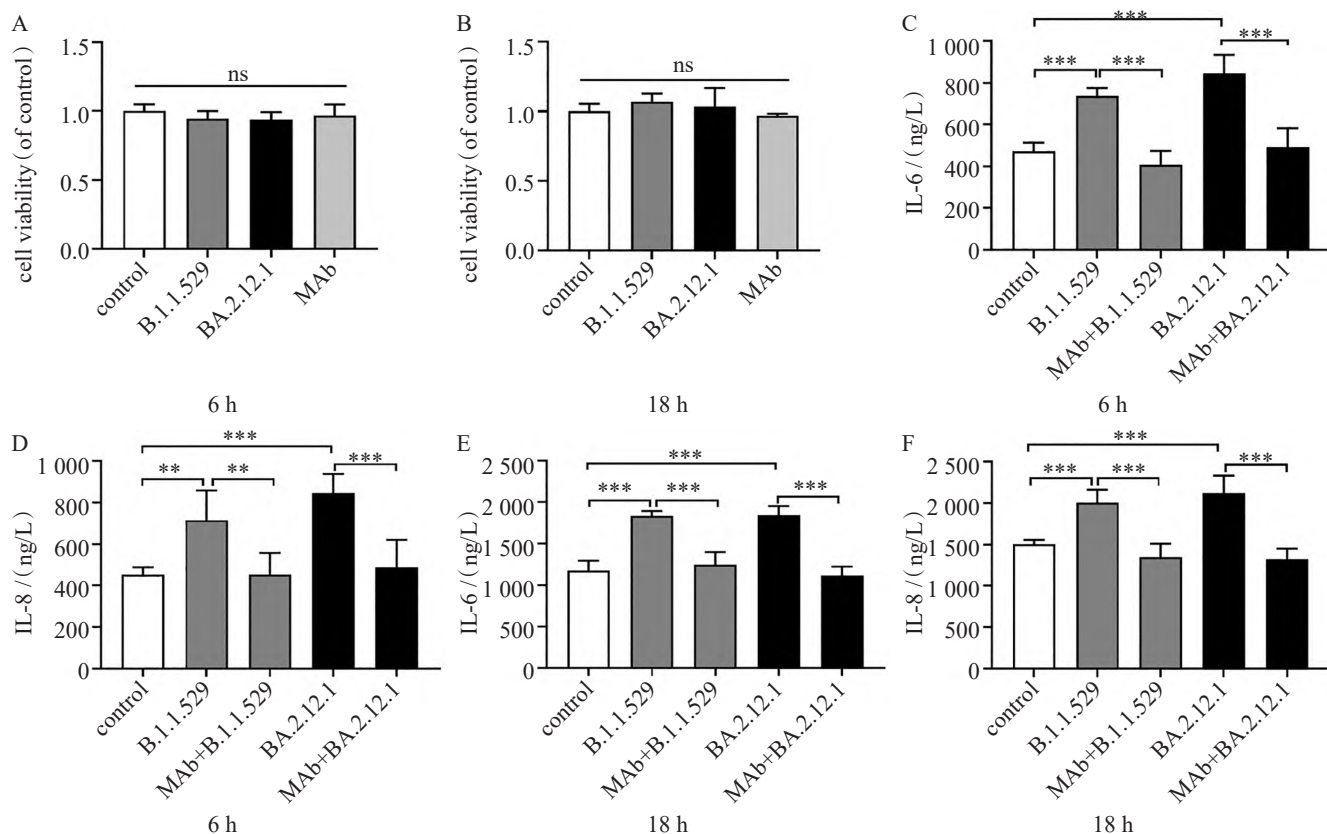
表 1 HO-1、MKP-1、P2Y₂ 和 GAPDH 引物序列

名称	序列 (5' → 3')	产物长度/bp
HO-1	Forward: AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC Reverse: AAAGCCCTACAGCAACTGTCTG	247
MKP-1	Forward: CCATCTGCCTTGCTTACCTT Reverse: AGCACCTGGGACTCAAACCTG	139
P2Y ₂	Forward: AGTGAGGAACCCGTGCAG Reverse: CCTCCAAGCTCTGGAACCT	74
GAPDH	Forward: CGGGAAGGAAATGAATGGGC Reverse: GCCCAATACGACCAAATCAGAGAAT	179

16HBE14o- 细胞, qRT-PCR 检测 HO-1、MKP-1 mRNA 表达, 结果显示 S1 蛋白引起 HO-1 (B.1.1.529: $t=4.748$, $P<0.01$; BA.2.12.1: $t=6.072$, $P<0.001$) 和 MKP-1 (B.1.1.529: $t=4.063$, $P<0.01$; BA.2.12.1: $t=5.615$, $P<0.001$) mRNA 的表达显著上调, 见图 2, 表明 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白能够独立于病毒诱导呼吸道上皮细胞产生炎症反应。

2.3 SARS-CoV-2 Omicron 变异株 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白诱导呼吸道上皮细胞胞外 ATP 水平升高

ELISA 检测 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白刺激的 16HBE14o- 细胞 6、18 h 培养物上清中 ATP 水平, 结果发现, S1 蛋白刺激 6 h (B.1.1.529: $t=8.100$, $P<0.001$; BA.2.12.1: $t=8.826$, $P<0.001$) 和 18 h (B.1.1.529:



A、B. CCK-8 检测 B.1.1.529、BA.2.12.1 S1 蛋白和 MAb 刺激 16HBE14o- 细胞 6、18 h 的细胞活力; C、D. ELISA 检测 B.1.1.529、BA.2.12.1 S1 蛋白和 MAb 刺激 16HBE14o- 细胞 6 h 的 IL-6、IL-8 水平; E、F. ELISA 检测 B.1.1.529、BA.2.12.1 S1 蛋白和 MAb 刺激 16HBE14o- 细胞 18 h 的 IL-6、IL-8 水平; $n=4$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $^{ns}P>0.05$

图 1 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白诱导 16HBE14o- 分泌 IL-6 和 IL-8

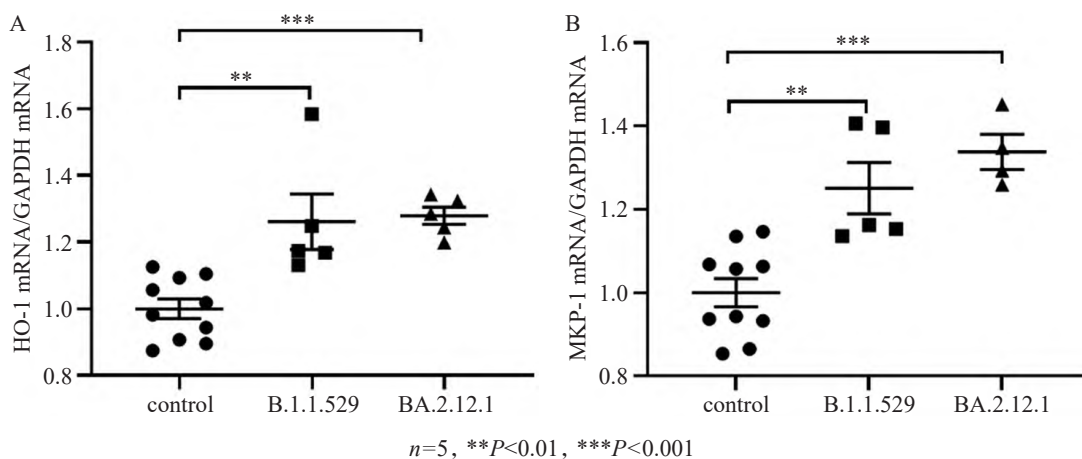


图 2 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白上调 HO-1 (A)、MKP-1 (B) mRNA 的表达

$t=8.699$, $P<0.001$; BA.2.12.1: $t=10.33$, $P<0.001$) 均能够诱导细胞分泌 ATP, 见图 3, 表明 S1 蛋白能够引起呼吸道上皮细胞胞外 ATP 水平升高, 而高水平的 ATP 可能是 S1 蛋白引发炎症反应的关键介质。

2.4 细胞外 ATP 通过 P2Y₂ 诱导 IL-6 和 IL-8 释放

通过核酸电泳分析了 16HBE14o- 细胞中 P2Y₂ 和 P2Y₄ 受体的表达, 结果显示, 16HBE14o- 细胞主要表达 P2Y₂ 受体, 而不表达 P2Y₄ 受体(图 4)。采用 qRT-PCR 探究 S1 蛋白是否能够上调 P2Y₂ mRNA 的

表达, 结果显示, S1 蛋白显著诱导了 P2Y₂ mRNA 的表达上调(B.1.1.529: $t=5.814$, $P<0.01$; BA.2.12.1: $t=6.630$, $P<0.001$)。Western blot 和 qRT-PCR 验证了 siRNA 敲低 P2Y₂ 受体效果($F=11.64$, $P<0.01$), 见图 5。使用 P2Y₂ siRNA (2-3) 敲低 P2Y₂ 受体, 检测 S1 蛋白诱导的炎症因子释放的变化, 结果如图 6 所示, 敲低 P2Y₂ 的表达, S1 蛋白刺激 16HBE14o- 细胞 6、18 h 能够显著降低 IL-6 和 IL-8 分泌(IL-6 6 h: $F=25.99$, $P<0.001$; IL-6 18 h: $F=30.44$, $P<0.001$; IL-8 6 h:

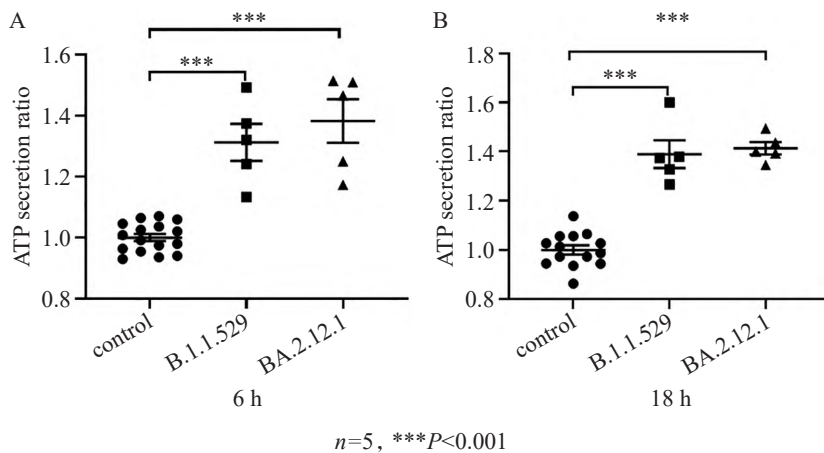


图3 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白刺激 6 h(A)、18 h(B) 的 16HBE14o- 细胞胞外 ATP 水平

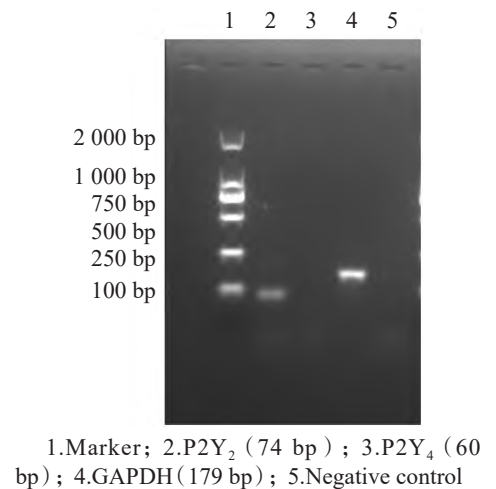


图4 核酸电泳显示目标基因片段

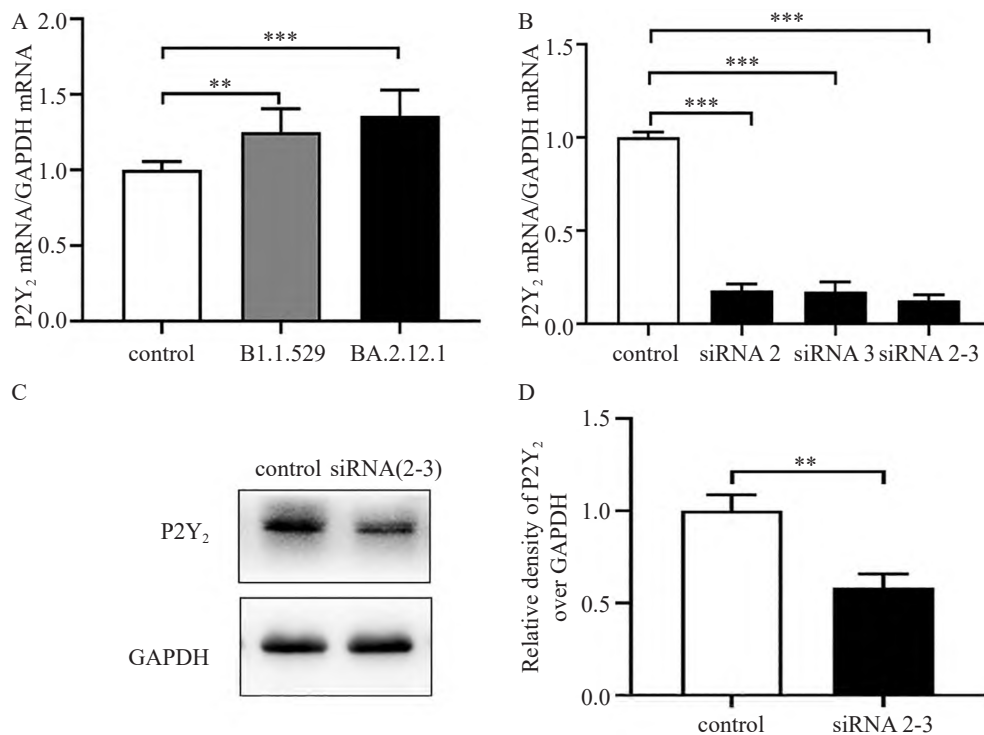


图5 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白上调 P2Y₂ mRNA 的表达

$F=55.49$, $P<0.001$; IL-8 18 h: $F=32.95$, $P<0.001$), 表明S1蛋白能够通过诱导胞外ATP水平的升高, 进而通过P2Y₂受体引发呼吸道上皮细胞炎症因子的释放。

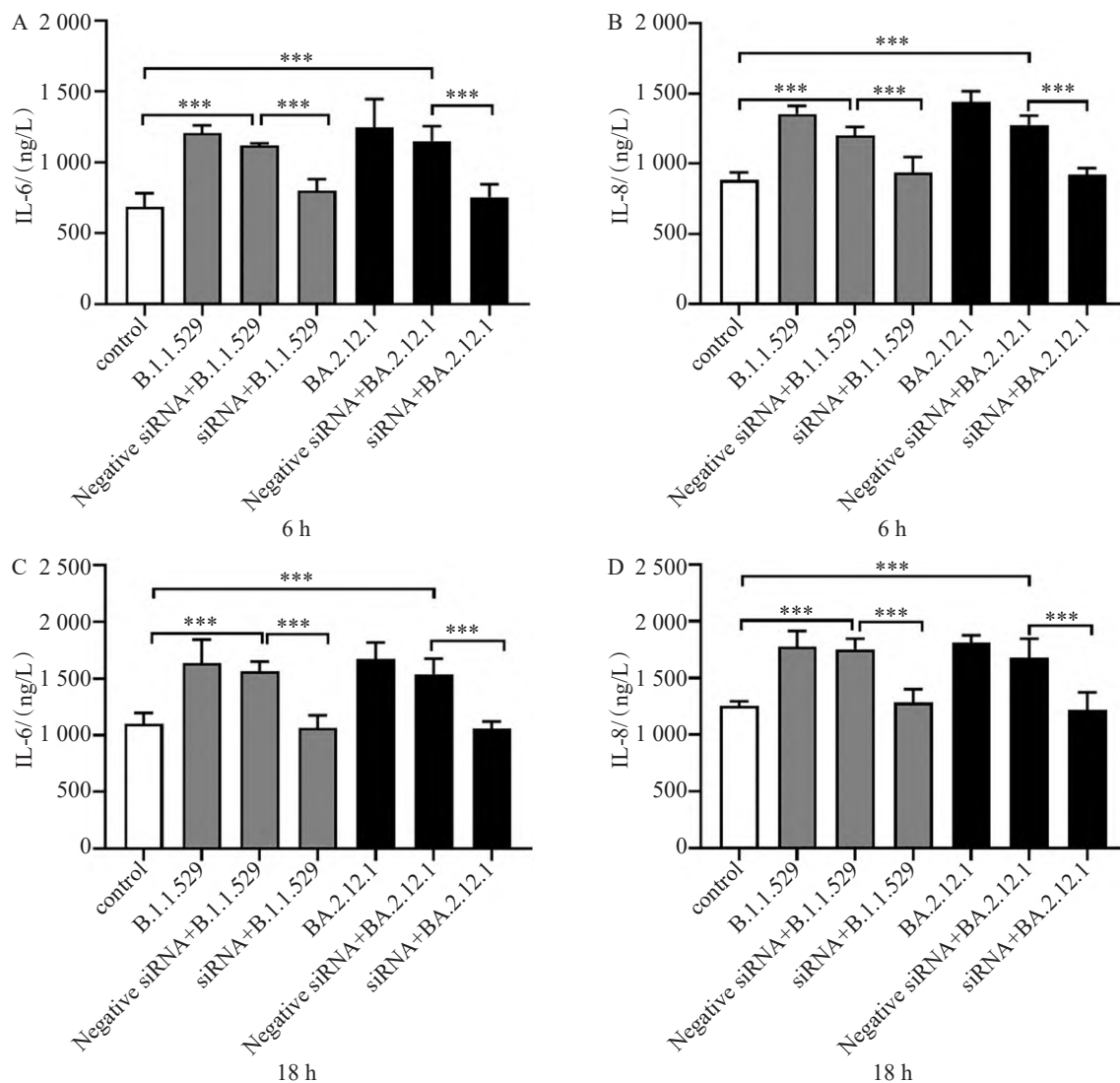
2.5 ERK1/2抑制剂抑制Omicron S1蛋白引起的呼吸道上皮细胞IL-6、IL-8的释放

采用ERK1/2抑制剂PD98059处理16HBE14o-细胞1 h后, S1蛋白刺激细胞6、18 h以探索ERK1/2是否参与SARS-CoV-2 S1蛋白诱导的炎症反应, 结果显示PD98059显著抑制了S1蛋白引起的IL-6 (6 h B.1.1.529: $t=6.619$, $P<0.001$; 6 h BA.2.12.1: $t=5.028$, $P<0.001$; 18 h B.1.1.529: $t=5.146$, $P<0.001$; 18 h BA.2.12.1: $t=5.441$, $P<0.001$) 和IL-8 (6 h B.1.1.529: $t=6.804$, $P<0.001$; 6 h BA.2.12.1: $t=5.485$, $P<0.001$; 18 h B.1.1.529: $t=5.883$,

$P<0.001$; 18 h BA.2.12.1: $t=7.055$, $P<0.001$) 的分泌, 见图7, 表明ERK1/2信号通路在SARS-CoV-2 S1蛋白引发的炎症反应中发挥着重要作用。

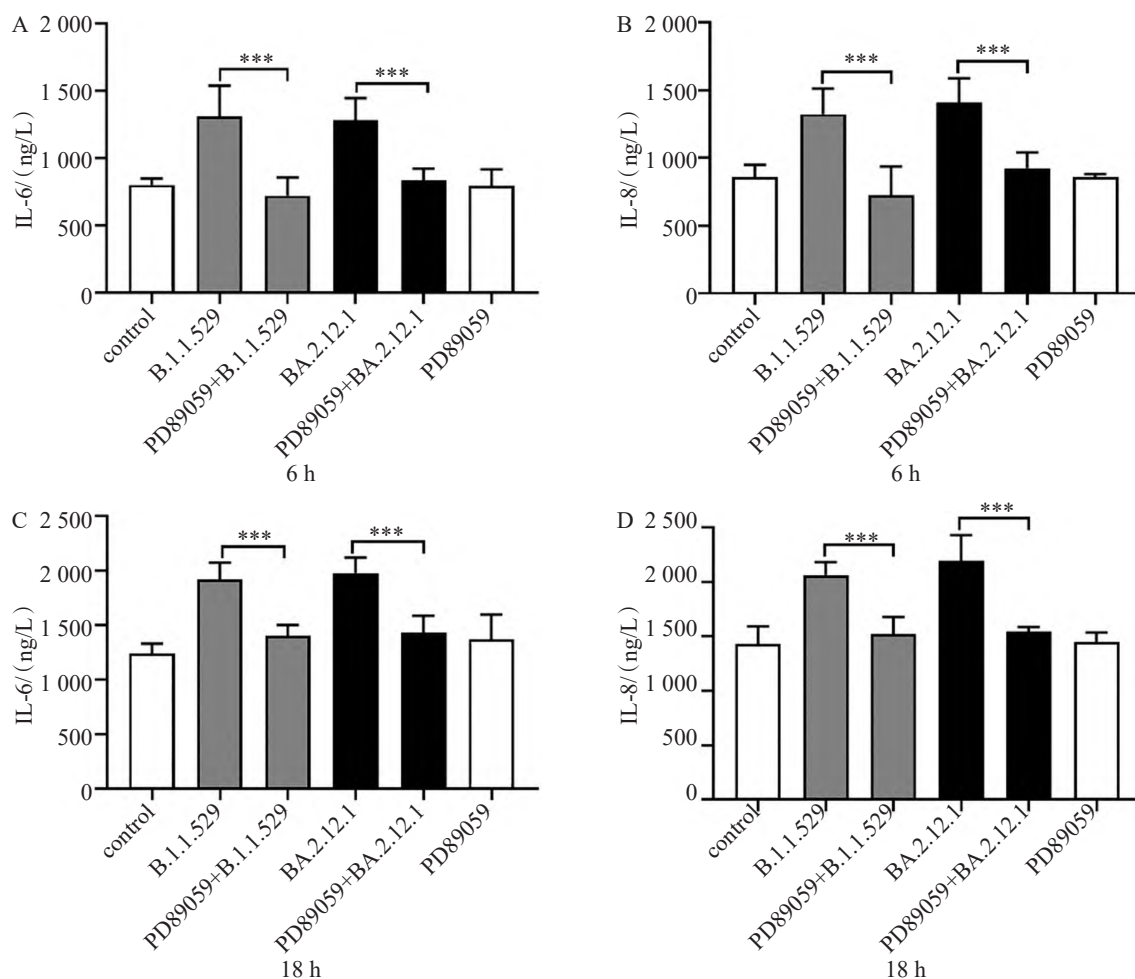
3 讨论

本研究结果发现SARS-CoV-2 Omicron变异株B.1.1.529和BA.2.12.1 S1蛋白能够独立于病毒诱导呼吸道上皮细胞释放IL-6和IL-8, 并上调HO-1、MKP-1 mRNA的表达(图1C~F, 图2), 表明Omicron变异株的S1蛋白能够直接诱导呼吸道上皮细胞的炎症反应。炎症因子(如IL-6和IL-8)的释放可能与COVID-19中的细胞因子风暴有关, 并可能加剧气道炎症。MAb抑制S1蛋白引起IL-6和IL-8的释放, 这与Omicron对抗体的敏感性一致^[17]。HO-1和MKP-1的上调进一步证实了S1蛋白能够引起气道炎症。重要的是, S1蛋



A、B. 敲低P2Y₂后, ELISA检测S1蛋白刺激细胞6 h细胞培养液上清中IL-6、IL-8水平; C、D. 敲低P2Y₂后, ELISA检测S1蛋白刺激细胞18 h细胞培养液上清中IL-6、IL-8水平; $n=5$, *** $P<0.001$

图6 细胞外ATP通过嘌呤能受体P2Y₂诱导IL-6和IL-8释放



A、B. ERK1/2 抑制剂PD98059 处理后, ELISA 检测 S1 蛋白刺激细胞 6 h 细胞培养液上清中 IL-6、IL-8 的水平; C、D. ELISA 检测 ERK1/2 抑制剂PD98059 处理后, S1 蛋白刺激细胞 18 h 细胞培养液上清中 IL-6、IL-8 的水平; $n=5$, *** $P<0.001$

图 7 MAPK/ERK1/2 信号通路参与 S1 蛋白诱导的 IL-6 和 IL-8 的释放

白对呼吸道上皮细胞的影响并非由于其本身的毒性, 因为细胞的活力并未受到显著影响(图 1A、B)。此外, S1 蛋白不仅诱导胞外 ATP 的分泌, 还上调了 P2Y₂ mRNA 的表达(图 3 和图 5A)。通过 siRNA 敲低 P2Y₂ 后, 本研究结果发现 S1 蛋白诱导的 IL-6 和 IL-8 的释放显著降低(图 6), 表明 SARS-CoV-2 的 S1 蛋白通过 ATP/P2Y₂ 信号通路引起呼吸道上皮细胞的炎症反应。同时, 结果还发现 S1 蛋白能够激活 ERK1/2 信号通路, 因为 ERK1/2 抑制剂 PD98059 能够抑制 S1 蛋白诱导的 IL-6 和 IL-8 的释放(图 7)。综上所述, 本研究结果揭示了 ATP/P2Y₂ 信号通路和 ERK 信号通路介导 S1 蛋白诱导呼吸道炎症反应的新机制, 为理解 SARS-CoV-2 感染引起的炎症机制提供了新的视角。

嘌呤能信号传导存在于免疫和炎症的各个方面, 并且越来越多的研究表明细胞外 ATP 及其腺苷(Ado)代谢物是炎症反应的主要介质^[18]。本研究发现 S1 蛋白诱导胞外 ATP 水平升高, 高水平的胞外 ATP 通过 P2Y₂

受体在 S 蛋白诱导的呼吸道上皮细胞炎症中发挥重要作用。ATP 作为嘌呤能系统中的信号分子, 参与细胞外环境中几种病理过程的调节。当细胞受到损伤后, 核苷酸被释放到细胞外环境中充当附近细胞和组织的信号传导, 随着细胞外核苷酸水平增加, 嘌呤能受体如 P2X 受体被激活, 其在巨噬细胞和中性粒细胞中表达上调, 并激活免疫系统, 产生炎症^[19]。此外, 释放到细胞外环境中的 ATP 也会激活 P2Y 受体如 P2Y₂, 产生高水平的细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α , 引发肺上皮和内皮损伤, 进而产生恶性循环, 加剧炎症反应, 导致细胞因子风暴^[20]。本文推测 ATP 可能参与 SARS-CoV-2 诱导的气道和肺部炎症。本研究中 S1 蛋白不仅能够引起 ATP 分泌还可上调 P2Y₂ 的表达(图 3、4、5A), 敲低 P2Y₂ 表达亦能明显抑制 S1 蛋白的促炎作用(图 6), 结果表明 ATP/P2Y₂ 参与了 S1 蛋白引起的人支气管上皮细胞炎症。Lin 等^[21]研究表明 ATP 可激活 ERK1/2 信号通路。前期研究亦发现 PD98059 能够显著抑制

ATP γ S 诱导的 IL-6 和 IL-8 的分泌^[22]。本研究也证实了 PD98059 能够抑制 S1 蛋白诱导的细胞因子的释放(图 7),表明 ERK1/2 参与了 S1 蛋白引起的炎症反应。

导致 COVID-19 恶化的主要原因之一是细胞因子风暴,而细胞因子会引发风暴导致急性呼吸窘迫综合征和多器官衰竭。S 蛋白是 SARS-CoV-2 病毒表面主要结构蛋白,它可以与宿主细胞中的 ACE2 结合,随后在跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (TMPRSS2) 和其他宿主蛋白酶辅助作用下导致病毒感染细胞,而 ACE2 存在于肺泡细胞和上皮细胞,这导致呼吸道成为 SARS-CoV-2 的主要感染部位^[23]。小胶质细胞直接暴露于 S1 导致 IL1 β 、IL6、TNF、Nlrp3 基因表达上调和 IL-1 β 、IL-6、TNF、CXCL1、IL-10 分泌增加,也可以导致人和鼠巨噬细胞、内皮细胞炎症^[24-26]。这表明 S 蛋白可能利用其他途径进入细胞,引起各种疾病^[27-28]。此外有报道称 SARS-CoV-2 可能通过激活或调节 G 蛋白偶联受体导致肺离子和液体运输失衡^[29]。本研究发现, SARS-CoV-2 S1 蛋白通过引起 ATP 分泌诱导炎症反应,但 S1 如何引起 ATP 分泌还未可知。SARS-CoV-2 S 蛋白可以通过 ACE2 感染细胞,截至目前,研究发现多种与 S 蛋白有关的受体或相互作用蛋白,如: TLR2、TLR4^[6, 30]、跨膜糖蛋白 CD147^[31]、整合素 (α V β 3 和 α 5 β 1)^[32]、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)^[33]、dipeptidyl peptidase IV (DPP4)、TMEM206B、neuropilin-1 (NRP1)、Asialoglycoprotein receptor 1 (ASGR1)、Transmembrane protein 30 (ATMEM30A)、C-type lectin domain family 4 member G (CLEC4G)、low-density lipoprotein receptor class A domain-containing protein 3 (LDLRAD3)^[34]。因此研究 SARS-CoV-2 S1 蛋白如何引起 ATP 分泌具有很大挑战,仍需要我们进一步探索。

突变对于蛋白质的稳定性有一定的影响, SARS-CoV-2 S 蛋白突变增强了病毒的传播和对宿主感染的能力。SARS-CoV-2 突变主要发生在受体结合域 (RBD) 中, RBD 突变后的病毒表现出相当强的传播力并且与受体结合强度和概率明显提高,可显著增强免疫逃逸能力。从原始的变异株到 Omicron 变异株,突变导致不同变异株之间存在明显差异。而 Omicron 变异株与原始株在 S1 蛋白的氨基酸序列上存在差异,这些差异主要集中在 RBD 和 S2 亚单位上,这些区域与病毒和宿主细胞的结合密切相关。Omicron 变异株 S1 蛋白在 RBD 区域引入了多个氨基酸替换,这些替换可能导致病毒与宿主细胞受体的结合亲和力降低,从而影响病毒进入宿主细胞的过程。其次, Omicron

变异株的 S1 蛋白可能通过不同的机制诱导细胞炎症。本研究结果表明 Omicron 变异株 S1 蛋白可能通过 ATP/P2Y₂ 信号通路和 ERK 信号通路介导呼吸道炎症反应。此外, Omicron 变异株 S1 蛋白可能通过激活宿主细胞内的炎症信号通路,导致细胞因子风暴,从而加剧气道炎症。目前, JN.1 变异株在全球流行毒株中的占比迅速上升,但其传播能力与 XBB 变异株差异并不明显,且含 XBB.1.5 成份的新冠疫苗仍对 JN.1 变异株有效。此外,其他结构蛋白如 N 蛋白也已被发现可以单独引起呼吸道炎症,因此对 SARS-CoV-2 的认识仍在持续更新,需要进一步报道和阐述,它们的特征和影响还需要进一步的研究。

综上所述, SARS-CoV-2 Omicron 变异株 B.1.1.529 和 BA.2.12.1 S1 蛋白通过 ATP/P2Y₂ 和 ERK1/2 信号通路诱导呼吸道上皮细胞炎症。而炎症反应是 COVID-19 患者临床症状之一,本研究为预防和治疗 SARS-CoV-2 感染提供了参考。

参考文献:

- [1] CHEN Y, GUO Y, PAN Y, et al. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(1): 135-140.
- [2] NEUFELDT C J, CERIKAN B, CORTESE M, et al. SARS-CoV-2 infection induces a pro-inflammatory cytokine response through cGAS-STING and NF-kappaB[J]. *Commun Biol*, 2022, 5(1): 45.
- [3] NILES M A, GOGESCH P, KRONHART S, et al. Macrophages and dendritic cells are not the major source of pro-inflammatory cytokines upon SARS-CoV-2 infection[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 647824.
- [4] ZHOU Z, REN L, ZHANG L, et al. Heightened innate immune responses in the respiratory tract of COVID-19 patients[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(6): 883-890.
- [5] QIN C, ZHOU L, HU Z, et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(15): 762-768.
- [6] KHAN S, SHAFIEI M S, LONGORIA C, et al. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF-kB pathway [J]. *Elife*, 2021, 10: e68563.
- [7] ROBLES J P, ZAMORA M, ADAN-CASTRO E, et al. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin α 5 β 1 and NF-kappaB signaling[J]. *J Biol Chem*, 2022, 298(3): 101695.
- [8] CORPETTI C, DEL RE A, SEGUILLA L, et al. Cannabidiol inhibits SARS-Cov-2 spike (S) protein-induced cytotoxicity and inflammation through a PPARgamma-dependent TLR4/NLRP3/Caspase-1 signaling suppression in Caco-2 cell line[J].

- Phytother Res, 2021, 35(12): 6893-6903.
- [9] BARHOUMI T, ALGHANEM B, SHAIBAH H, et al. SARS-CoV-2 coronavirus spike protein-induced apoptosis, inflammatory, and oxidative stress responses in THP-1-like-macrophages: Potential role of angiotensin-converting enzyme inhibitor (perindopril)[J]. Front Immunol, 2021, 12: 728896.
- [10] LI F, LI J, WANG P H, et al. SARS-CoV-2 spike promotes inflammation and apoptosis through autophagy by ROS-suppressed PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867(12): 166260.
- [11] BOURS M J, SWENNEN E L, DI VIRGILIO F, et al. Adenosine 5' -triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation[J]. Pharmacol Ther, 2006, 112(2): 358-404.
- [12] BURNSTOCK G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling[J]. Pharmacol Rev, 2006, 58(1): 58-86.
- [13] ROBSON S C, KACZMAREK E, SIEGEL J B, et al. Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation[J]. J Exp Med, 1997, 185(1): 153-163.
- [14] KELLERMAN D, ROSSI MOSPAN A, ENGELS J, et al. Denufosal: A review of studies with inhaled P2Y(2) agonists that led to Phase 3[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2008, 21(4): 600-607.
- [15] LOMMATZSCH M, CICKO S, MULLER T, et al. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(9): 928-934.
- [16] WONG A M, CHOW A W, AU S C, et al. Apical versus basolateral P2Y(6) receptor-mediated Cl(-) secretion in immortalized bronchial epithelia[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 40(6): 733-745.
- [17] KURHADE C, ZOU J, XIA H, et al. Neutralization of Omicron BA.1, BA.2, and BA.3 SARS-CoV-2 by 3 doses of BNT162b2 vaccine[J]. Nat commun, 2022, 13(1): 3602.
- [18] DI VIRGILIO F, VUERICH M. Purinergic signaling in the immune system[J]. Auton Neurosci, 2015, 191: 117-123.
- [19] LEÃO BATISTA SIMÕES J, FORNARI BASSO H, CRISTINE KOSVOSKI G, et al. Targeting purinergic receptors to suppress the cytokine storm induced by SARS-CoV-2 infection in pulmonary tissue [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 100: 108150.
- [20] PACHECO P A F, FARIA R X. The potential involvement of P2X7 receptor in COVID-19 pathogenesis: A new therapeutic target?[J]. Scand J Immunol, 2021, 93(2): e12960.
- [21] LIN C C, LIN W N, WANG W J, et al. Functional coupling expression of COX-2 and cPLA2 induced by ATP in rat vascular smooth muscle cells: Role of ERK1/2, p38 MAPK, and NF-kappaB[J]. Cardiovasc Res, 2009, 82(3): 522-531.
- [22] ZHANG R G, LIU X J, GUO Y L, et al. SARS-CoV-2 spike protein receptor binding domain promotes IL-6 and IL-8 release via ATP/P2Y₂ and ERK1/2 signaling pathways in human bronchial epithelia[J]. Mol Immunol, 2024, 167: 53-61.
- [23] LI X Y, YUAN H J, LI X Z, et al. Spike protein mediated membrane fusion during SARS-CoV-2 infection[J]. J Med Virol, 2023, 95(1): e28212.
- [24] JOVER E, MATILLA L, GARAIKOETXEA M, et al. Beneficial effects of mineralocorticoid receptor pathway blockade against endothelial inflammation induced by SARS-CoV-2 spike protein[J]. Biomedicines, 2021, 9(6): 639.
- [25] ROBLES J P, ZAMORA M, ADAN-CASTRO E, et al. The spike protein of SARS-CoV-2 induces endothelial inflammation through integrin $\alpha 5 \beta 1$ and NF- κ B signaling[J]. J Biol Chem, 2022, 298(3): 101695.
- [26] FRANK M G, NGUYEN K H, BALL J B, et al. SARS-CoV-2 spike S1 subunit induces neuroinflammatory, microglial and behavioral sickness responses: Evidence of PAMP-like properties[J]. Brain Behav Immun, 2022, 100: 267-277.
- [27] FONTES-DANTAS F L, FERNANDES G G, GUTMAN E G, et al. SARS-CoV-2 Spike protein induces TLR4-mediated long-term cognitive dysfunction recapitulating post-COVID-19 syndrome in mice[J]. Cell Rep, 2023, 42(3): 112189.
- [28] ZALPOOR H, AKBARI A, SAMEI A, et al. The roles of Eph receptors, neuropilin-1, P2X7, and CD147 in COVID-19-associated neurodegenerative diseases: Inflammasome and Jak inhibitors as potential promising therapies[J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 10.
- [29] ABDEL HAMEID R, CORMET-BOYAKA E, KUEBLER W M, et al. SARS-CoV-2 may hijack GPCR signaling pathways to dysregulate lung ion and fluid transport[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2021, 320(3): L430-L435.
- [30] WANG K, CHEN W, ZHANG Z, et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 283.
- [31] BEAUDOIN C A, HAMAIA S W, HUANG C L, et al. Can the SARS-CoV-2 spike protein bind integrins independent of the RGD sequence?[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 765300.
- [32] HAN B, LV Y, MOSER D, et al. ACE2-independent SARS-CoV-2 virus entry through cell surface GRP78 on monocytes-evidence from a translational clinical and experimental approach[J]. EBioMedicine, 2023, 98: 104869.
- [33] ALIPOOR S D, MIRSAEIDI M. SARS-CoV-2 cell entry beyond the ACE2 receptor[J]. Mol Biol Rep, 2022, 49(11): 10715-10727.
- [34] ROBERTS D S, MANN M, LI B H, et al. Distinct core glycan and O-glycoform utilization of SARS-CoV-2 Omicron variant Spike protein RBD revealed by top-down mass spectrometry [J]. Chem Sci, 2022, 13(36): 10944-10949.

(责任编辑: 李 晓)