

# NLRP3炎症小体在甲型流感病毒H1N1预感染降低小鼠巨噬细胞抗MRSA免疫中的作用

师小函, 石云锋, 巴俊慧, 罗进梅, 胡佳佳, 吴本权  
(中山大学附属第三医院MICU, 呼吸与危重症医学科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】研究NLRP3炎症小体在经甲型流感病毒H1N1预感染的小鼠巨噬细胞抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)免疫中的活性及作用。【方法】以MRSA分别感染小鼠巨噬细胞(MRSA组)和以甲流病毒H1N1预感染1周的巨噬细胞(H1N1+MRSA组), 荧光定量PCR检测各组细胞NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 的mRNA表达强度, 免疫荧光及western blot检测细胞中NLRP3的蛋白表达强度, ELISA检测细胞上清液IL-1 $\beta$ 的浓度。【结果】MRSA组NLRP3、Caspase-1的mRNA表达水平与空白对照组比无统计学差异( $P$ 均 $>0.05$ ), NLRP3的蛋白表达水平与空白对照组比无统计学差异( $P>0.05$ ), MRSA组IL-1 $\beta$ 的mRNA表达及上清液浓度均明显高于空白对照组( $P$ 均 $<0.01$ )。H1N1+MRSA组NLRP3、Caspase-1的mRNA表达水平均高于空白对照组( $P$ 均 $<0.01$ ), NLRP3的蛋白表达水平高于空白对照组( $P<0.01$ ), 上清液IL-1 $\beta$ 浓度高于空白对照组( $P<0.01$ )。H1N1+MRSA组NLRP3的mRNA表达水平及蛋白表达水平均高于MRSA组( $P$ 均 $<0.01$ ), 然而其IL-1 $\beta$  mRNA表达水平低于MRSA组, 上清液IL-1 $\beta$ 浓度明显低于MRSA组( $P<0.01$ )。【结论】MRSA感染肺泡巨噬细胞引起IL-1 $\beta$ 的释放不依赖NLRP3炎症小体途径, 甲流病毒预感染降低了巨噬细胞抗MRSA免疫IL-1 $\beta$ 的表达, 该效应可能是甲流病毒感染易继发MRSA肺炎的机制之一。

**关键词:** NLRP3炎症小体; 甲型流感病毒H1N1; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 继发感染

中图分类号: R563.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2020)04-0542-07

## Role of NLRP3 Inflammasome in Influenza A Virus H1N1 Attenuates Immunity Against Secondary MRSA Infection in Vitro

SHI Xiao-han, SHI Yun-feng, BA Jun-hui, LUO Jin-mei, HU Jia-jia, WU Ben-quan

(Department of MICU, Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: WU Ben-quan; E-mail: zswbq@163.com

**Abstract:** 【Objective】 To explore the role of NLRP3 inflammasome in methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) infection secondary to influenza A virus H1N1 (IAV H1N1) in vitro. 【Methods】 Macrophages RAW264.7 were cultured and then infected with only MRSA for 24 h (MRSA group) and with MRSA for 24 h secondary to H1N1 infection for 1 week in advance (MRSA+H1N1 group), respectively. Fluorescence quantitative PCR was applied to detect the transcription of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$ , immunofluorescence and western blot were used to detect NLRP3 protein in cells, and the concentration of IL-1 $\beta$  in supernatant was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). 【Results】 In MRSA group, the transcriptions of NLRP3 and Caspase-1 mRNA, as well as translation of NLRP3, showed no difference compared with control group, while the expression of IL-1 $\beta$  mRNA and the concentration of IL-1 $\beta$  in supernatant were significantly higher than those in control group (both  $P<0.01$ ). In H1N1+MRSA group, the transcription of NLRP3 and Caspase-1 were significantly higher than those in control group (both  $P<0.01$ ), the translation of NLRP3 was significantly higher than that in control group ( $P<0.01$ ), the concentration of IL-1 $\beta$  was significantly higher than that

收稿日期: 2020-01-02

基金项目: 广东省科技计划项目(2017A020215177)

作者简介: 师小函, 硕士, 研究方向: 重症及呼吸系统感染性疾病, E-mail: shingxh@yeah.net; 吴本权, 通信作者, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 重症与感染性疾病, E-mail: zswbq@163.com

in control group ( $P<0.01$ ). In H1N1+MRSA group, the transcription and translation of NLRP3 were significantly higher than those in MRSA group (both  $P<0.01$ ), while the transcription of IL-1 $\beta$  was lower than that in MRSA group, and the concentration of IL-1 $\beta$  in supernatant was significantly lower than that in MRSA group ( $P<0.01$ ).【Conclusions】 Our study suggests that IL-1 $\beta$  secretion induced by MRSA infection is in a NLRP3 inflammasome independent manner in macrophage. It also suggests that influenza A virus H1N1 infection in advance decreases the release of IL-1 $\beta$  induced by secondary MRSA infection ultimately, which may contribute to the mechanism of MRSA pneumonia secondary to IAV infection.

**Key words:** NLRP3 Inflammasome; influenza A virus H1N1; methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA); secondary infection

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2020, 41(4): 542-548]

甲型流感病毒(甲流病毒)引起呼吸道感染,变异株易引起大范围流感爆发流行<sup>[1-2]</sup>,如1918年西班牙H1N1大流感,导致将近5 000万人死亡。人类感染甲流病毒后易继发耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA)感染,导致重症肺炎<sup>[3]</sup>。甲流病毒感染1周是继发MRSA肺炎的高峰期。国内外对甲流病毒继发MRSA感染的机制研究多数关注上皮细胞粘附性的增加及局部免疫屏障的破坏等<sup>[4-5]</sup>。近年研究发现NLRP3(nucleotide oligomerization and binding domain-like receptor P3, NLRP3)炎症小体在抗甲流病毒免疫中起重要作用<sup>[6-7]</sup>。研究发现MRSA感染亦能激活NLRP3炎症小体<sup>[8]</sup>。甲流病毒联合MRSA感染降低了NLRP3炎症小体介导的IL-1 $\beta$ 的释放,加剧MRSA肺炎<sup>[9]</sup>。但在临床真实的病理生理状况,即甲流病毒感染后继发MRSA感染,NLRP3炎症小体在其中的具体作用如何,未见相关研究。本研究以MRSA感染经甲流病毒H1N1预感染1周的小鼠巨噬细胞,研究NLRP3炎症小体在甲流病毒感染继发MRSA肺炎中活性及其作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞系、病毒株和菌株

小鼠巨噬细胞RAW264.7购自于中国医学科学院基础医学院细胞中心。甲流病毒H1N1/FM1为鼠肺适应株,获赠于暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室。MRSA菌株为中山大学附属第三医院呼吸与危重症医学科实验室分离鉴定的临床菌株。实验均在实验室同意的情况下在生物安全柜中进行操作。

### 1.2 试剂和材料

MLV第一链合成试剂盒、SYBR® select master mix购于美国Life Technologies公司。NLRP3单克隆兔抗体购于美国Cell Signaling Technology公司。NLRP3免疫荧光羊抗兔二抗购于美国R&D公司。Hoechst33342购于中国谷歌生物科技公司。内参抗体GAPDH兔抗体及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗、凯基全蛋白提取试剂盒及凯基BCA法蛋白浓度检测试剂盒购于广州杰特伟科技有限公司。ELISA检测试剂盒购于美国R&D公司。

### 1.3 细胞培养

以完全培养基在25 mL培养瓶中培养RAW 264.7细胞,置于37℃、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱内,当细胞融合至约70%培养瓶底面积且状态良好时用胰酶消化传代。实验细胞均处于其对数生长期,MTT染色细胞活力>98%。

### 1.4 甲流病毒H1N1复苏和毒力测定

复苏液氮罐中冻存的H1N1/FM1病毒株,于9日龄鸡胚尿囊腔连续传代2次扩增,以鸡红细胞血凝试验测定扩增的病毒效价。以无血清DMEM培养液对H1N1/FM1病毒株行连续10倍递次稀释至10<sup>-8</sup>。以RAW264.7细胞检测计算病毒半数组织培养感染计量(median tissue culture infective dose, TCID<sub>50</sub>)<sup>[10]</sup>。

### 1.5 细菌培养

解冻-80℃冻存的MRSA菌株,接种于血琼脂培养基并37℃温箱培养,挑取菌落溶于无菌PBS中,测定其在600 nm处吸光度(optical density, OD600),OD600=0.6时细菌含量为1×10<sup>9</sup>/mL。

### 1.6 甲流病毒H1N1、MRSA感染小鼠巨噬细胞及分组

取对数生长期的RAW264.7细胞按1×10<sup>6</sup>/mL

密度接种于6孔板,每孔加入完全培养基2 mL,待细胞扩增至 $2 \times 10^6$ 时作为实验起点0 h,换液,H1N1预感染组加入病毒。根据病毒TCID<sub>50</sub>的测定结果,每孔加入100  $\mu$ L的10 TCID<sub>50</sub>病毒稀释液。根据预实验结果,MRSA按感染复数(multiplicity of infection, MOI)10:1加入培养板中感染细胞。空白对照组无干预,MRSA组在常规培养168 h(1周)后加MRSA感染24 h,H1N1+MRSA组在H1N1感染168 h(1周)后加MRSA序贯感染24 h。细胞分别于第0、48、96和144 h换培养液,实验终点统一收集细胞。

### 1.7 RT-qPCR法检测NLRP3、Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的mRNA表达水平

收集上述各组细胞,用Trizol法提取细胞总RNA,检测RNA浓度。采用ABI7500系统进行PCR反应,反应条件为:50  $^{\circ}$ C 2 min,95  $^{\circ}$ C 2 min预变性,95  $^{\circ}$ C 15 s变性、60  $^{\circ}$ C 1 min退火,共进行40个循环,95  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 1 min,95  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 15 s延伸。记录目的基因与内参基因的Ct值,用 $mRNA=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算mRNA相对表达量。PCR反应引物见表1。

### 1.8 免疫荧光检测NLRP3蛋白强度

根据操作流程完成如下步骤:40 g/L多聚甲醛固定细胞、0.5% TritonX-100室温通透、5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭、孵育NLRP3一抗、孵育荧光二抗、Hoechst33342复染、加防荧光淬灭剂,之后置于激光共聚焦显微镜下观察。期间注意磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤及后期避光操作。

### 1.9 Western Blot法检测NLRP3的蛋白表达水平

收集各组细胞后提取总蛋白。按凯基BCA蛋白含量检测试剂盒说明书,测定蛋白浓度。按Western Blot步骤,转膜,封闭,一抗孵育,二抗孵育,在Chemi Scope化学发光成像系统显影,用Im-

age J软件分析NLRP3的蛋白灰度值,计算其蛋白相对表达量。

### 1.10 ELISA检测血清中IL-1 $\beta$ 的浓度

根据ELISA检测试剂盒的操作流程,空白孔及每个标准品设3个复孔,制作标准曲线,检测细胞上清液IL-1 $\beta$ 的浓度。

### 1.11 统计学方法

采用SPSS Statistics 20.0软件统计分析。数据均符合正态性分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足方差齐性的组间比较采用单因素方差分析,有统计学意义,两两比较采用LSD法。不符合方差齐性的组间比较采用Kruskal-Wallis H检验,有统计学意义时采用Bonferroni法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞生长状态

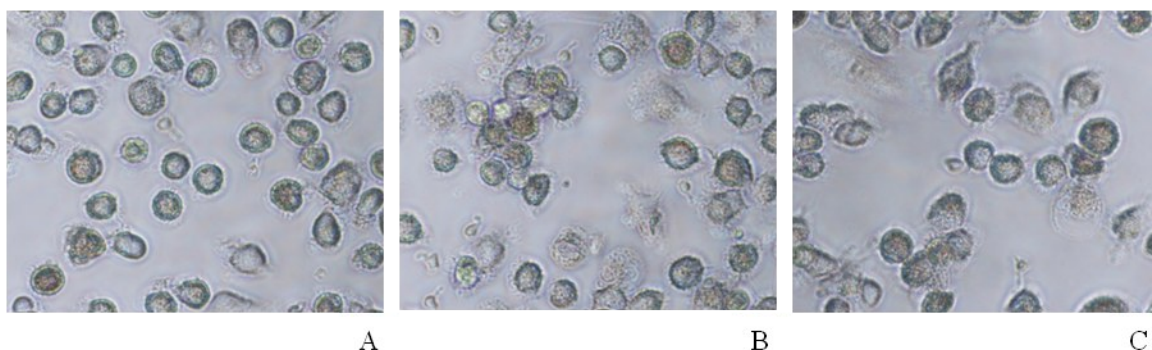
显微镜下观察实验细胞贴壁牢固,外形为类圆形,折光率均一,实验过程中细胞继续生长,至铺满孔板接触抑制。甲流病毒感染期间细胞形态未见明显变化。各组细胞培养至1周时仍生长良好,实验组加入MRSA感染24 h后可见胞周折光率稍增高(图1)。各组细胞均完成实验。

### 2.2 各组巨噬细胞NLRP3、Caspase-1及IL-1 $\beta$ 的mRNA相对表达量

NLRP3的mRNA表达水平各组总体分布不完全相同( $H=6.286, P=0.043$ ),MRSA组相对空白对照组基本未见升高( $P=1.00$ ;图2A),而在H1N1+MRSA组表达明显升高,与空白对照组、MRSA组比较差异均有统计学意义( $P$ 均=0.026;图2A)。Caspase-1的mRNA表达水平各组总体分布不完全相同( $H=7.048, P=0.029$ ),MRSA组相对空白对照

表1 NLRP3蛋白、Caspase-1和IL-1 $\beta$  mRNA的引物序列  
Table 1 Primer sequences of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$  mRNA

Target gene	Primer sequences	
	Forward	Reverse
NLRP3	ACTGAAGCACCTGCTCTGCAAC	AACCAATGCGAGATCCTGACAAC
Caspase-1	TATAATGAAAGACGGCACACC	AGTCACAAGACCAGGCATATTCT
IL-1 $\beta$	GAGCACCTTCTTTTCCTTCATCTT	TCACACACCAGCAGGTTATCATC
$\beta$ -actin	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT



A: control group; B: MRSA group; C: H1N1+MRSA group. Light microscope,  $\times 200$

图1 光学显微镜下各组细胞生长状态

Fig.1 Growth state of cells in each group under light microscope

组也未见明显升高( $P=0.383$ ;图2B),但在H1N1+MRSA组较空白对照组明显升高,差异有统计学意义( $P=0.009$ ;图2B)。IL-1 $\beta$ 的mRNA表达水平各组总体分布不完全相同( $H=8.535, P=0.014$ ),MRSA组较空白对照组明显升高( $P=0.004$ ;图2C),较H1N1+MRSA组也升高,但差异没有统计学意义( $P=0.211$ ;图2C)。IL-1 $\beta$ 的mRNA表达水平在H1N1+MRSA组较空白对照组也升高,但差异没有统计学意义( $P=0.118$ ;图2C)。

### 2.3 各组巨噬细胞NLRP3蛋白免疫荧光强度

MRSA组巨噬细胞NLRP3蛋白免疫荧光稍增强,H1N1+MRSA组NLRP3蛋白免疫荧光强度明显高于空白对照组及MRSA组,表明H1N1+MRSA组NLRP3

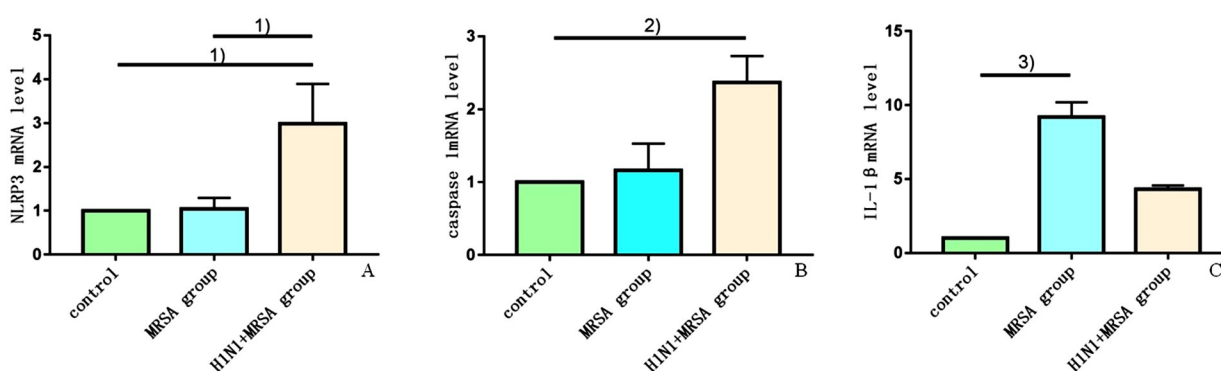
蛋白分布密度及范围高于空白对照组与MRSA组,变化趋势与其mRNA表达水平相一致(图3)。

### 2.4 各组巨噬细胞NLRP3的蛋白相对表达量

NLRP3的蛋白表达水平各组总体分布不完全相同( $F=353.524, P=0.000$ ),MRSA组比空白对照组未见升高( $P=0.132$ ;图4),而在H1N1+MRSA组表达明显升高,与空白对照组、MRSA组比较差异均有统计学意义( $P$ 均=0.000;图4)。

### 2.5 各组巨噬细胞上清液IL-1 $\beta$ 浓度

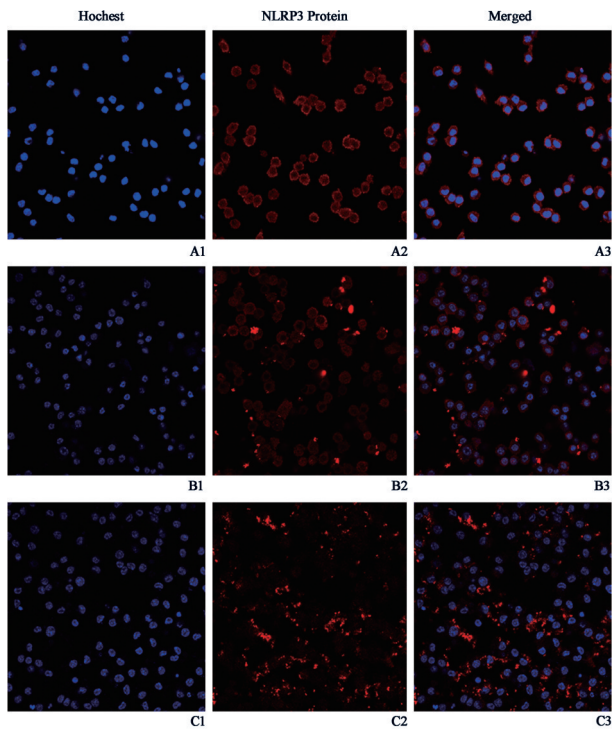
细胞上清液IL-1 $\beta$ 浓度各组总体分布不完全相同( $F=160.75, P=0.000$ ),与空白对照组比,MRSA组细胞培养上清液IL-1 $\beta$ 浓度明显升高,H1N1+MRSA组上清液中IL-1 $\beta$ 浓度也升高。同时,



A: The expression of NLRP3 mRNA in H1N1+MRSA group was significantly higher than that in blank group or MRSA group. Data were expressed as Mean $\pm$ SD,  $n \geq 3$ ,  $H=6.286, P=0.043$ ; 1)  $P=0.026$  vs. control or MRSA group by bonferroni multiple-comparison test after Kruskal-Wallis. B: The expression of caspase-1 mRNA in H1N1+MRSA group was significantly higher than that in blank group. Data were expressed as Mean $\pm$ SD,  $n \geq 3$ ,  $H=7.048, P=0.009$ ; 2)  $P=0.009$  vs. control by bonferroni multiple-comparison test after Kruskal-Wallis. C: The expression of IL-1 $\beta$  mRNA in MRSA group was significantly higher than that in blank group. Data were expressed as Mean $\pm$ SD,  $n \geq 3$ ,  $H=8.535, P=0.014$ , 3)  $P=0.004$  vs. control by bonferroni multiple-comparison test after Kruskal-Wallis.

图2 荧光定量PCR检测小鼠巨噬细胞NLRP3、Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的mRNA相对表达量

Fig.2 mRNA level of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$  detected by fluorescence RT-PCR



A: control group; B: MRSA group; C: H1N1+MRSA group. Immunofluorescence staining,  $\times 400$ . The density of NLRP3 detected by immunofluorescence in H1N1+MRSA group were significantly higher than those in blank group and MRSA group.

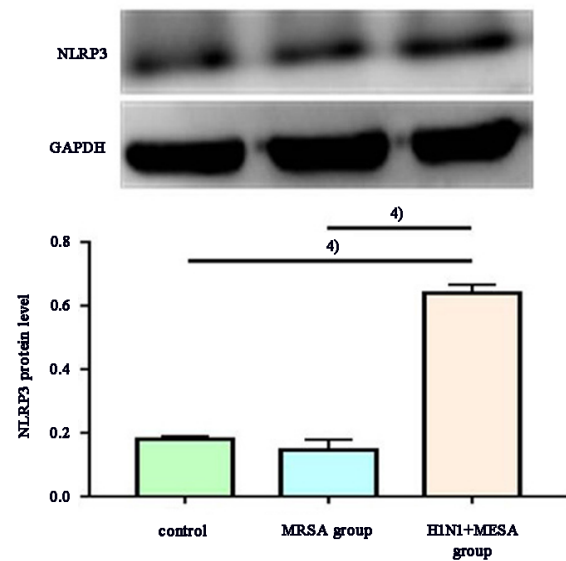
图3 免疫荧光检测小鼠巨噬细胞NLRP3蛋白密度及分布  
Fig.3 Density and distribution of NLRP3 protein detected by immunofluorescence

H1N1+MRSA组IL-1 $\beta$ 浓度低于MRSA组。两两比较的差异均有统计学意义( $P$ 分别为0.000、0.001、0.000;图5);MRSA组和空白对照组相比,IL-1 $\beta$ 上清液浓度与mRNA表达水平的结果相一致。

### 3 讨论

甲流病毒致病机制为感染呼吸道上皮细胞及肺泡巨噬细胞等免疫细胞,引起剧烈的炎症反应。MRSA可定植于人体鼻咽部,其主要的致病因子包括磷壁酸、肽聚糖及外毒素等,当局部或全身免疫力下降时,引起MRSA侵袭性肺炎。甲流病毒感染患者继发MRSA肺炎,是导致重症肺炎甚至临床死亡的主要原因。临床发现甲流病毒感染后约1周时间是继发MRSA肺炎的高峰期<sup>[8-10]</sup>。这些线索提示甲流病毒与MRSA在致病及免疫应答方面存在相关性。

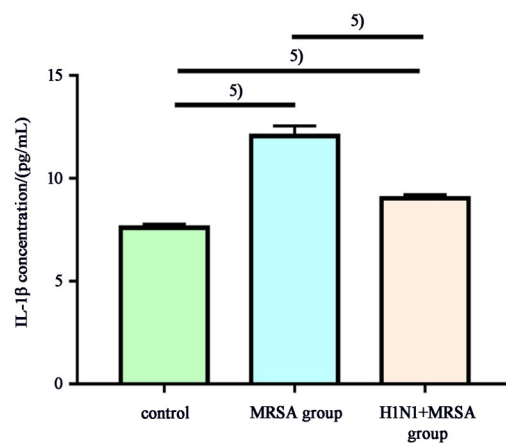
肺泡巨噬细胞是抗甲流病毒及MRSA感染



The translation of NLRP3 in H1N1+MRSA group was significantly higher than those in control group or MRSA group. Data were expressed as Mean $\pm$ SD,  $n \geq 3$ ,  $F=353.524$ ,  $P=0.000$ ; 4)  $P=0.000$  vs. control or MRSA group by bonferroni multiple-comparison test after Kruskal-Wallis.

图4 Western blot检测小鼠巨噬细胞NLRP3的蛋白相对表达量

Fig.4 Translation of NLRP3 detected by western blot



The concentration of IL-1 $\beta$  in supernatant in H1N1+MRSA group was lower than that in MRSA group, while higher than that in control group. Data were expressed as Mean $\pm$ SD,  $n \geq 3$ ,  $F=160.75$ ,  $P=0.000$ , 5)  $P < 0.01$  vs control by LSD- $t$  test after one-way ANOVA.

图5 ELISA检测小鼠巨噬细胞培养上清液IL-1 $\beta$ 的浓度  
Fig.5 The concentrations of IL-1 $\beta$  in supernatant measured by ELISA

最重要的免疫细胞,主要由Toll样受体(Toll like receptor, TLR)、NOD样受体(NOD like receptor, NLR)等模式识别受体识别甲流病毒及MRSA的相

成分,介导固有免疫与特异性免疫应答<sup>[11]</sup>。

TLR在细菌感染中作用及机制已有大量研究。如本课题组研究发现MRSA可通过TLR<sub>2</sub>/TLR<sub>4</sub>-NF- $\kappa$ B途径引起肺泡巨噬细胞坏死及肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、IL-10的释放<sup>[12-13]</sup>。NLR在感染中的作用以NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体研究最为深入<sup>[6]</sup>。NLRP3炎症小体主要表达于单核巨噬细胞,是NLRP3蛋白、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)与半胱天冬酶1(caspase-1)形成的三聚体,诱导白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-18的释放,介导下游的炎症反应。NLRP3炎症小体途径的IL-1 $\beta$ 释放需要双信号通道。第一信号为TLR识别病原微生物及其组成成分,通过NF- $\kappa$ B途径,诱导IL-1 $\beta$ 的基因转录和翻译,生成无活性的pro-IL-1 $\beta$ 。第2信号为NLRP3炎症小体三聚体形成,自剪切无活性的caspase-1为活化的cleaved-caspase-1,cleaved-caspase-1剪切pro-IL-1 $\beta$ 为活性的IL-1 $\beta$ 。NLRP3、caspase-1及IL-1 $\beta$ 是监测该炎症小体活性及炎症反应的良好指标。

主流研究<sup>[7]</sup>认为,甲流病毒感染巨噬细胞通过NLRP3炎症小体途径促进IL-1 $\beta$ 的释放。本课题组前期研究也验证,甲流病毒H1N1感染巨噬细胞1周明显激活NLRP3炎症小体<sup>[8]</sup>。虽然也有研究发现MRSA可通过吞噬-溶酶体途径产生的活性氧激活NLRP3炎症小体<sup>[9]</sup>,但对NLRP3炎症小体在MRSA感染中的作用及机制存在较多争议。Robinson等<sup>[14]</sup>研究发现,甲流病毒联合MRSA感染小鼠,NF- $\kappa$ B信号途径受到抑制,Pro-IL-1 $\beta$ 的产生及活性IL-1 $\beta$ 的释放均降低,加剧MRSA肺炎,但该研究未进一步揭示NLRP3炎症小体在其中的作用。

分析本实验结果,MRSA组比空白对照组IL-1 $\beta$ 的mRNA表达及上清液浓度均明显升高,是MRSA感染引起严重肺炎的分子机制。但MRSA组NLRP3、caspase-1的mRNA表达均没有增强,NLRP3蛋白免疫荧光强度也未见明显增强,western blot检测NLRP3的蛋白表达量没有增加,表明MRSA感染巨噬细胞24 h引起IL-1 $\beta$ 的转录及分泌并不依赖NLRP3炎症小体途径。研究<sup>[14-15]</sup>发现金

葡菌联合甲流病毒感染引起肺泡上皮细胞从凋亡向坏死性改变,并不是NLRP3炎症小体介导的焦亡。而我们前期研究已发现MRSA感染引起巨噬细胞坏死性改变是由TLR信号途径介导<sup>[12-13]</sup>。Richa等<sup>[16]</sup>发现金黄色葡萄球菌中枢神经感染由ASC而不是NLRP3介导炎症反应及保护作用。本研究结果与上述研究结论相一致。

进一步分析实验结果,甲流病毒预感染后继发MRSA感染,NLRP3、caspase-1的mRNA表达均有增强,NLRP3蛋白免疫荧光密度及分布也明显增加、增多,western blot检测NLRP3的蛋白表达量明显增加,上清液中IL-1 $\beta$ 浓度也升高,表明NLRP3炎症小体信号通路的激活。但甲流病毒预感染组与单纯MRSA感染相比,虽然NLRP3的mRNA表达量、免疫荧光密度及蛋白表达量均增强,但IL-1 $\beta$ 的mRNA表达及上清液浓度均降低。综上所述结果表明,甲流病毒H1N1预感染1周继发MRSA感染虽然激活了NLRP3炎症小体通路,但总体上降低了MRSA感染引起的IL-1 $\beta$ 的表达。推论可能的机制为甲流病毒预感染激活NLRP3炎症小体第一信号通路的TLR<sub>17</sub>,竞争性抑制了巨噬细胞抗MRSA免疫的TLR<sub>2</sub>、TLR<sub>4</sub>信号通路,总体上降低了巨噬细胞对MRSA的免疫反应。有观察到类似现象的研究,甲流病毒感染抑制吞噬细胞NADPH氧化酶依赖的细菌清除作用,增加了继发MRSA感染的易感性<sup>[5]</sup>。同时,因为IL-1 $\beta$ 是炎症反应重要的上游促炎症细胞因子,IL-1 $\beta$ 表达及分泌下降削弱了机体免疫强度及对MRSA的清除能力,该效应可能是甲流病毒感染易继发MRSA肺炎的机制之一。

综上所述,本实验发现MRSA感染肺泡巨噬细胞引起IL-1 $\beta$ 的释放不依赖NLRP3炎症小体途径,甲流病毒预感染降低了巨噬细胞抗MRSA免疫IL-1 $\beta$ 的表达,该效应可能是甲流病毒感染易继发MRSA肺炎的机制之一。同时,NLRP3炎症小体在机体发生甲流病毒感染继发MRSA肺炎时的具体作用、机制以及信号网络如何,关于TLR<sub>17</sub>与TLR<sub>2</sub>、TLR<sub>4</sub>信号通路的推论,都将有待于进一步的研究明确。

## 参考文献

- [1] Watanabe T, Watanabe S, Maher EA, et al. Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses [J]. *Trends in Microbiol*, 2014, 22(11): 623-631.
- [2] Li H, Cao B. Pandemic and avian influenza a virus in humans: epidemiology, virology, clinical characteristics, and treatment strategy [J]. *Clin Chest Med*, 2017, 38(1): 59-70.
- [3] Robinson KM, Kolls JK, Alcorn JF. The immunology of influenza virus-associated bacterial pneumonia [J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 34: 59-67.
- [4] Nichol ME, Ciric J, Falcinelli SD, et al. Characterization of host and bacterial contributions to lung barrier dysfunction following co-infection with 2009 pandemic influenza and methicillin resistant staphylococcus aureus [J]. *Viruses*, 2019, 11(2): E116.
- [5] Sun K, Metzger DW. Influenza infection suppresses NADPH oxidase-dependent phagocytic bacterial clearance and enhances susceptibility to secondary MRSA infection [J]. *J Immunol*, 2014, 192(7): 3301-3307.
- [6] Tate MD, Mansell A. An update on the NLRP3 inflammasome and influenza: the road to redemption or perdition? [J]. *Curr Opin Immunol*, 2018, 54: 80-85.
- [7] Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7): 677-687.
- [8] 师小函, 吴本权, 石云锋, 等. 甲型流感病毒 H1N1/FM1 对小鼠巨噬细胞 NLRP3 炎症小体信号通路的影响 [J]. *新医学*, 2017, 48(5): 302-307.
- Shi XH, Wu BQ, Shi YF, et al. Effect of influenza A virus H1N1/FM1 on macrophage NLRP3 inflammasome signaling pathway in mouse [J]. *J New Med*, 2017, 48(5): 302-307.
- [9] Muller S, Wolf AJ, Iliev ID, et al. Poorly cross-linked peptidoglycan in MRSA due to mecA induction activates the inflammasome and exacerbates immunopathology [J]. *Cell Host & Microbe*, 2015, 18(5): 604-612.
- [10] 张梦媛, 颜宇琦, 秦洪琼, 等. 小檗碱对甲型流感病毒 FM1 株感染小鼠肺中 RLH 信号通路的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(6): 834-839.
- Zhang MY, Yan YQ, Qin HQ, et al. Effect of berberine on RLH signaling pathway in lung of mice infected by influenza a [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2016, 37(6): 834-839.
- [11] Halstead ES, Chroneos ZC. Lethal influenza infection: Is a macrophage to blame? [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2015, 13(12): 1425-1428.
- [12] 吴本权, 石云锋, 黄静, 等. 重组金黄葡萄球菌杀白细胞毒素体外对人肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 2 表达的影响 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2009, 21(11): 1008.
- Wu BQ, Shi YF, Huang J, et al. Recombinant Pantone-Valentine Leukocidin induce up-regulation of Toll-like receptor 2 on human alveolar macrophage in vitro [J]. *Chin J Microbiol Immunol*, 2009, 21(11): 1008.
- [13] 吴本权, 石云锋, 黄静, 等. 重组金黄色葡萄球菌杀白细胞毒素对人肺泡巨噬细胞细胞因子表达的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(7): 503-507.
- Wu BQ, Shi YF, Huang J, et al. The effect of recombinant pantone-valentine leukocidin on the production of cytokines by human alveolar macrophages [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2009, 32(7): 503-507.
- [14] Robinson KM, Choi SM, McHugh KJ, et al. Influenza A exacerbates staphylococcus aureus pneumonia by attenuating IL-1 $\beta$  production in mice [J]. *J Immunol*, 2013, 191(10): 5153-5159.
- [15] van Kruchten A, Wilden JJ, Niemann S, et al. Staphylococcus aureus triggers a shift from influenza virus-induced apoptosis to necrotic cell death [J]. *FASEB J*, 2018, 32(10): 2779-2793.
- [16] Richa H, Amy A, Tammy K. Critical role for the AIM2 inflammasome during acute central nervous system bacterial infection [J]. *J Neurochem*, 2014, 129(4): 704-711.

(编辑 余菁)