

【靶向免疫系统感染性疾病与肿瘤药物干预】

血必净注射液对多种病毒的抑制作用及机制研究

张美琦¹, 王浩嘉², 李艺颖², 王靳勇¹, 王雪娇², 王 遥², 贾 鑫^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029

摘要: 目的 在细胞水平评价血必净注射液(简称血必净)对水疱性口炎病毒(VSV)、甲型流感病毒(H1N1)、I型单纯疱疹病毒(HSV-1)等多种病毒复制的影响,并探讨其与免疫系统相关的作用机制。方法 通过CCK-8法检测血必净对A549细胞活力的影响;采用流式细胞术及实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术检测血必净对VSV-eGFP、H1N1、HSV-1复制的影响;利用碘化丙啶(PI)染色检测血必净对病毒引起的细胞死亡的影响;qRT-PCR检测血必净对干扰素(IFN)及干扰素刺激基因(ISGs)mRNA水平的影响,以及其对病毒引起的促炎细胞因子基因表达的影响。结果 血必净以剂量相关方式抑制VSV、H1N1及HSV-1等病毒的复制($P<0.001$),并显著减少病毒诱导的细胞死亡($P<0.05$);血必净能有效降低病毒感染诱导的*IL1B*、*IL6*、*TNFA*基因的表达($P<0.05$),并抑制*IFIT1*、*IFIT2*等ISGs的表达($P<0.05$)。结论 血必净能在体外抑制多种病毒的复制,降低病毒诱导的细胞死亡和炎症反应,其抗病毒的机制可能独立于I型IFN信号通路。

关键词: 血必净注射液; 病毒; 细胞死亡; I型干扰素; 炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)09-1697-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.001

Inhibition and mechanism of Xuebijing Injection on various viruses

ZHANG Meiqi¹, WANG Haojia², LI Yiyang², WANG Jinyong¹, WANG Xuejiao², WANG Yao², JIA Xin¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To evaluate the treatment effect and underlying mechanism of Xuebijing Injection (XBJ) on the replication of vesicular stomatitis virus (VSV), influenza A virus (H1N1), herpes simplex virus 1 (HSV-1) and other viruses *in vitro*. **Methods** CCK8 assay was performed to detect the cell viability of different concentrations of XBJ treated on A549 cells. Flow cytometry and qRT-PCR were conducted to analyze viral replications. The cells were stained with propidium iodide (PI) and calculated by high content imaging to determine cell death. Effect of XBJ on the mRNA levels of *IFNBI*, interferon-stimulated genes (ISGs) (*IFIT1*, *IFIT2*, *IFI44*, *IFIH1*, *OAS2*), and proinflammatory cytokines (*IL1B*, *IL6*, *TNFA*) expression were analyzed by qRT-PCR. **Results** Low cytotoxic concentration (20, 40, 80 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) of XBJ were selected for subsequent study. XBJ efficiently suppressed VSV, H1N1 and HSV-1 replication in a dose-dependent manner ($P<0.001$). Meanwhile, compared with the control group, virus-induced cell death and inflammatory response were reduced by XBJ treatment ($P<0.05$). In addition, XBJ could effectively reduce the expression of *IL1B*, *IL6* and *TNFA* genes induced by virus infection ($P<0.05$), and inhibit the expression of ISGs such as *IFIT1* and *IFIT2* ($P<0.05$). **Conclusion** XBJ inhibits the replication of several viruses by reducing virus-induced cell death and inflammatory response in an IFN independent manner.

Key words: Xuebijing Injection; virus; cell death; type I interferon; inflammatory cytokine

血必净注射液(简称血必净)由经典方剂血府逐瘀汤化裁而来,由红花、赤芍、川芎、丹参、当归5味中药共同配伍,具有行气活血、清热凉血、解毒止痛的功效。血必净是目前国内唯一经国家药品监

督管理局(SFDA)批准的治疗全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症(sepsis)、多器官功能障碍综合征(MODS)的中药注射液;目前临床上,血必净与抗生素联用能降低脓毒症的死亡率和并发症的产

收稿日期: 2022-05-09

基金项目: 中国科协青年人才托举工程(2020-QNRC1-03);国家自然科学基金资助项目(31900661, 82001663)

第一作者: 张美琦(1998—),女,硕士研究生。E-mail: zhangmeiqi@bucm.edu.cn

*通信作者: 贾 鑫,副教授,研究方向为抗炎、抗病毒免疫中药药理。E-mail: jiaxin@bucm.edu.cn

生^[1]。研究表明,血必净可以抑制白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等促炎细胞因子的释放^[2],下调TNF- α 和核转录因子- κ B(NF- κ B)的信号转导^[3],调控Th17和调节性T细胞(Treg)的分化,缓解早期过度的先天免疫反应,维持免疫系统的平衡^[4],其还可通过减弱炎症和凝血之间的相互作用,保护内皮细胞,维持重要器官的生理功能^[5]。此外,最新的研究表明,血必净对重症及危重型新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者肺炎严重指数(PSI)和肺部损伤具有显著的改善作用^[6-7],已被《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)》列为临床治疗期(确诊病例)重型和危重型推荐用药^[8]。然而,血必净体外对病毒复制的影响及作用机制罕见报道。本研究通过建立病毒感染的细胞模型,以细胞内病毒载量为主要指标,评价血必净体外对多种病毒的抑制作用,并探讨其与免疫系统相关的作用机制,为血必净抗病毒感染的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞与病毒

人肺上皮细胞系A549细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)公司;小鼠原代成纤维MEF细胞来源于本实验室冻存;水疱性口炎病毒(VSV,印第安纳株)、带绿色荧光蛋白的水疱性口炎病毒(VSV-GFP)、甲型流感病毒(H1N1,PR8株)、I型单纯疱疹病毒(HSV-1)均来自本实验室。

1.2 实验仪器

Epoch全波长酶标仪(美国Bio Tek公司);Fresco17高速冷冻离心机(美国Thermo公司);CytoFLEX流式细胞仪(美国Beckman公司);BioRad CFX96荧光定量PCR仪(美国BioRad公司);高内涵细胞成像分析系统IN Cell Analyzer 2500HS(英国GE Healthcare公司)。

1.3 药物与主要试剂

血必净注射液(天津红日药业股份有限公司,规格:每支10 mL,批号2102221);CCK-8试剂盒(货号:CK04)购于东仁化学科技有限公司;Trizol(货号:15596018)和转染试剂聚乙烯亚胺(PEI,货号:BMS1003-A)购于Invitrogen公司;Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qRT-PCR(货号:AG11711)和SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qRT-PCR试剂盒(货号:AG11701)购于湖南艾科瑞生物工程有限公司;核酸类似物poly(I:C)(货号:tlrl-picw)购于InvivoGen公司;Hoechst 33342(货号:A3472)购于

Apexbio公司;碘化丙啶(PI,货号:11348639001)购自Sigma公司;胎牛血清(FBS,货号:2358184P)、高糖DMEM培养基(货号:8121475)和1%青霉素-链霉素(货号:15140122)购于Gibco公司。

2 方法

2.1 细胞培养及实验分组

A549细胞和MEF细胞均培养在含10%FBS,1%青霉素-链霉素的完全DMEM培养基中,37℃、5%CO₂恒温培养,待长满后进行传代,取对数生长期细胞进行后续实验。血必净使用时溶于完全培养基中,配成含血必净2%、4%、8%的稀释液(即20、40、80 μ L $\cdot$ mL⁻¹),现用现配。实验分为对照组、模型组[病毒感染组或poly(I:C)刺激组]、药物处理组,具体处理方法如下:对照组给予完全培养基正常培养;模型组:根据实验要求使用病毒感染或poly(I:C)刺激;药物处理组:根据实验要求使用病毒感染,同时使用不同体积分数的血必净(20、40、80 μ L $\cdot$ mL⁻¹)处理或poly(I:C)转染后,使用血必净(80 μ L $\cdot$ mL⁻¹)处理。

2.2 CCK-8检测细胞活力

取对数生长期A549细胞,制成细胞悬液进行计数,以每孔 1.5×10^4 个细胞接种到96孔板中,过夜培养;待细胞生长至70%~80%,加入不同体积分数的血必净(50、100、150、200、250、300、350、400 μ L $\cdot$ mL⁻¹)进行处理,并设置空白孔和对照孔(空白组:不含细胞,含CCK-8;对照孔:含细胞及CCK-8),每组各3个复孔,于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养;24 h后,每孔加入10 μ L CCK-8溶液,轻轻振摇培养板,使CCK-8溶液和培养基充分混匀;将培养板在培养箱内孵育30 min,用酶标仪测定450 nm处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 流式细胞仪检测VSV-eGFP的复制

A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种到24孔板中,过夜培养。VSV-eGFP以感染复数(MOI)为0.01感染A549细胞,同时用不同体积分数血必净(20、40、80 μ L $\cdot$ mL⁻¹)处理细胞。12 h后,冷PBS洗涤1次,收集细胞悬液,使其重悬于含1%FBS的PBS中,计数10 000个细胞,CytoFLEX流式细胞仪进行后续分析。

2.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测病毒复制

A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种到24孔板中,MEF细胞以每孔 2.5×10^5 个接种到12孔板中,过夜培养。VSV-eGFP以MOI为0.01感染MEF细胞12 h,

HSV-1 以 MOI 为 0.1 感染 A549 细胞 24 h, H1N1 以 MOI 为 0.1 感染 A549 细胞 8 h, 同时用不同体积分数的血必净 (20、40、80 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理。药物处理指定时间后, 收集细胞, 使用 Trizol 提取总 RNA。使用 Evo M-MLV RT 试剂盒和 gDNA Clean for qRT-PCR 试剂盒合成 cDNA, 使用 SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qRT-PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 实验。以 β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。qRT-PCR 检测病毒复制。引物序列

见表 1。

2.5 PI/Hoechst 33342 染色检测细胞死亡

A549 细胞以每孔 1.5×10^5 个接种于 24 孔板, 过夜培养。VSV 以 MOI 为 0.1 或 H1N1 以 MOI 为 1 感染 A549 细胞 24 h, 同时用不同体积分数的血必净 (20、40、80 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理。24 h 后, A549 细胞 PBS 洗 3 遍, 以 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PI 和 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Hoechst 33342 室温下染色 10 min, 避光, PBS 洗 3 遍, 每孔加入 200 μL 4% 多聚甲醛固定, 使用 IN Cell Analyzer

表 1 引物序列

Table 1 Primers used for gene amplification

基因	物种	引物序列 (5'→3')
<i>ACTB</i>	人	F-CATGTACGTTGCTATCCAGGC R-CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>IFIT1</i>	人	F-AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA R-CTGAAACCGACCATAGTGGAAT
<i>IFIT2</i>	人	F-GACACGGTTAAAGTGTGGAGG R-TCCAGACGGTAGCTTGCTATT
<i>IFI44</i>	人	F-ATGGCAGTGACAACCTCGTTTG R-TCCTGGTAACTCTCTTCTGCATA
<i>OAS2</i>	人	F-ACGTGACATCCTCGATAAACTG R-GAACCCATCAAGGGACTTCTG
<i>IFIH1</i>	人	F-TCACAAGTTGATGGTCCTCAAGT R-CTGATGAGTTATTCTCCATGCCC
<i>IL1B</i>	人	F-AGCTACGAATCTCCGACCAC R-CGTTATCCCATGTGTGCAAGAA
<i>IL6</i>	人	F-ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG R-CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG
<i>TNFA</i>	人	F-GAGGCCAAGCCCTGGTATG R-CGGGCCGATTGATCTCAGC
<i>IFNB1</i>	人	F-GCTTGGATTCTACAAAGAAGCA R-ATAGATGGTCAATGCGGCGTC
<i>Actin</i>	鼠	F-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA R-GCCGGACTCATCGTACTCC
<i>Il1b</i>	鼠	F-CTGTGACTCATGGGATGATGATG R-CGGAGCCTGTAGTGCAGTTG
<i>Il6</i>	鼠	F-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG R-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
<i>Tnf</i>	鼠	F-CAGGCGGTGCCTATGTCTC R-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
H1N1-HA		F-CCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA R-GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT
VSV-G		F-CAAGTCAAATGCCCAAGAGTCACA R-TTTCCTTGCAATTGTTCTACAGATGG
HSV-ICP27		F-TTCTCCAGTGCTACCTGAAGG R-TCAACTCGCAGACACGACTCG

2500HS 进行高内涵成像,计算PI阳性细胞的百分比,随机取9个视野进行量化。

2.6 qRT-PCR检测干扰素 β (IFNB1)及干扰素刺激基因(ISGs)的表达

A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种到24孔板中,过夜培养。A549细胞中,加入不同体积分数血必净(20、40、80 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)处理12 h后,收集细胞,qRT-PCR检测血必净单独处理对IFNB1及ISGs的影响。

A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种于24孔板,过夜培养。待细胞生长至70%,poly(I:C)质量浓度为1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,PEI质量浓度为2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,进行转染,6 h后换液,加入血必净(80 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)处理。实验分为对照组、poly(I:C)组、药物处理组。12 h后收集细胞,qRT-PCR检测IFNB1及ISGs的变化(qRT-PCR检测方法详见“2.4”项操作)。

2.7 qRT-PCR检测促炎细胞因子的变化

A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种到24孔板中,MEF细胞以每孔 2.5×10^5 个接种到12孔板中,过夜培养。VSV-eGFP以MOI为0.01感染A549细胞12 h,HSV-1以MOI为0.1感染MEF细胞8 h,同时加入血必净(80 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)处理。指定时间收集细胞,qRT-PCR检测促炎细胞因子的变化(qRT-PCR检测方法详见“2.4”项操作)。

2.8 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用one-way-ANOVA, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,每组实验3次生物学重复。

3 结果

3.1 血必净细胞无毒浓度的确定

通过CCK-8检测发现,不同体积分数的血必净处理A549细胞24 h后,细胞的存活率如图1所示,其半数细胞毒性浓度(CC_{50})为534.7 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此,后续实验选取无明显细胞毒性的低、中、高体积分数(20、40、80 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行。

3.2 血必净对多种病毒复制的影响

利用VSV-eGFP以MOI为0.01感染A549细胞,同时用不同体积分数的血必净处理12 h,流式细胞术检测GFP阳性率(GFP的阳性率反映VSV-eGFP病毒的复制情况),结果见图2,与模型组比较,血必净以剂量依赖方式抑制VSV-eGFP复制($P < 0.001$)。

VSV-eGFP以MOI为0.01感染MEF细胞12 h,HSV-1以MOI为0.1感染A549细胞24 h,H1N1以MOI为0.1感染A549细胞8 h,同时用不同体积分数

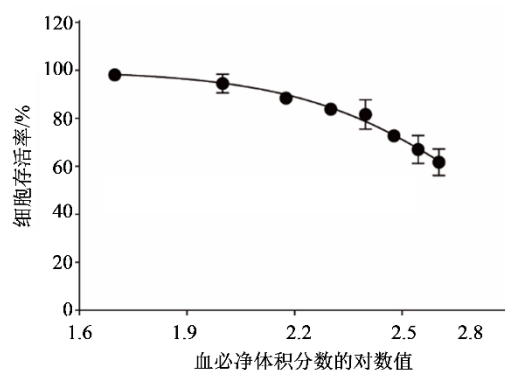
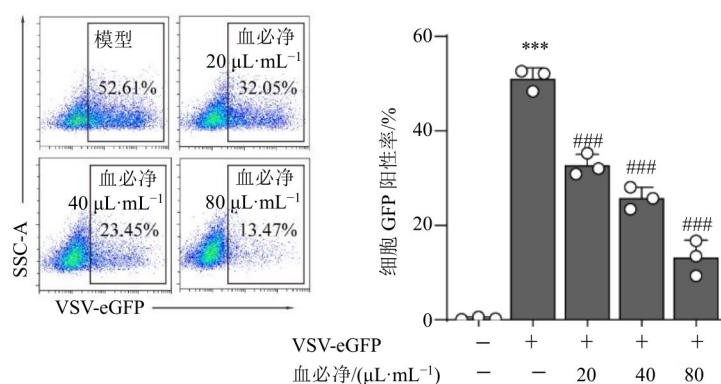


图1 CCK-8法检测血必净对A549细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of Xuebijing on viability of A549 cells detected by CCK-8 method ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较:*** $P < 0.001$;与模型(病毒感染)组比较:### $P < 0.001$
*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model (viral infection) group

图2 流式细胞术检测血必净对VSV-eGFP在A549细胞中复制的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of Xuebijing on VSV-eGFP replication in A549 cells detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的血必净(20、40、80 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理。qRT-PCR结果显示,血必净能在MEF细胞中显著抑制VSV-eGFP的复制($P<0.001$)。通过qRT-PCR实验还发现,在A549细胞中血必净能以剂量依赖的方式降低DNA病毒HSV-1和RNA病毒H1N1的复制($P<0.001$)。结果见图3。

3.3 血必净对病毒诱导的细胞死亡的影响

病毒感染细胞诱发的细胞死亡,可能是其诱发病毒感染部位过度炎症反应的重要机制。因此,利用病毒感染细胞模型,通过PI染色和高内涵荧光成像考察血必净对病毒诱导的细胞死亡的影响。VSV以MOI为0.1或H1N1以MOI为1感染A549细胞24 h,同时用不同体积分数血必净(20、40、80 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理24 h,检测结果见图4、5。与对照组比较,H1N1以MOI为1感染A549细胞后,PI阳性率增加,表明细胞死亡增多($P<0.001$),加入血

必净处理后,H1N1诱导的细胞死亡显著减少($P<0.001$)。与对照组比较,VSV感染A549细胞后,也能明显诱导细胞死亡($P<0.001$),加入血必净处理后,低、中、高剂量血必净组能明显减少细胞死亡($P<0.05,0.001$)。可见,血必净能减少H1N1和VSV病毒诱导的A549细胞死亡。

3.4 血必净对A549细胞I型干扰素通路相关基因表达的影响

I型干扰素(IFN)在宿主抗病毒免疫中发挥重要作用,其诱导的ISGs可以直接靶向病毒复制周期的各个阶段或调控宿主的抗病毒免疫过程^[9]。在A549细胞中,单独加入不同体积分数血必净(20、40、80 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理12 h后,qRT-PCR检测IFNB1及ISGs的变化。如图6所示,血必净单独处理对IFNB1及IFIT1、IFIT2、IFI44、IFIH1和OAS2基因的表达无显著影响($P>0.05$)。

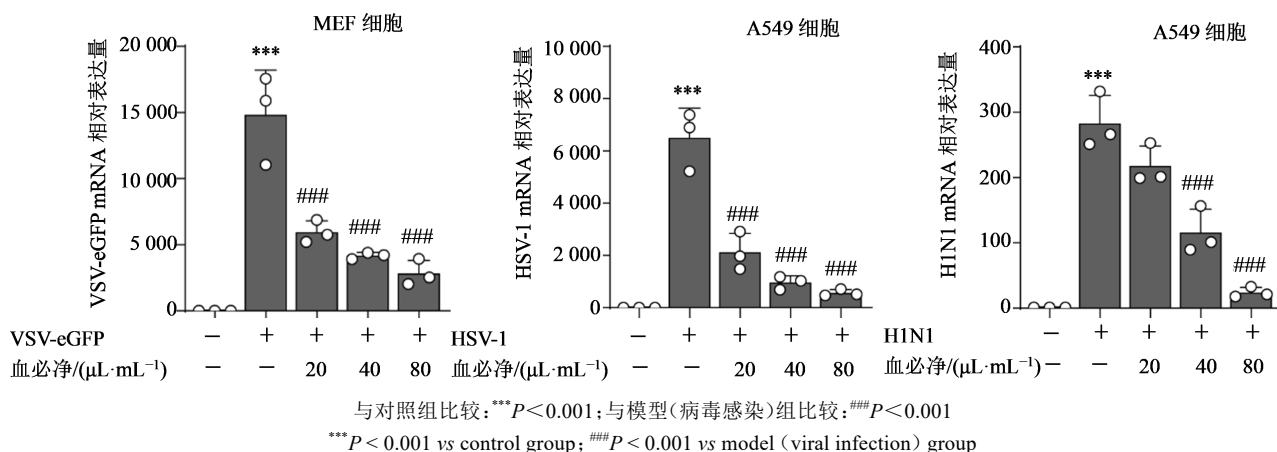
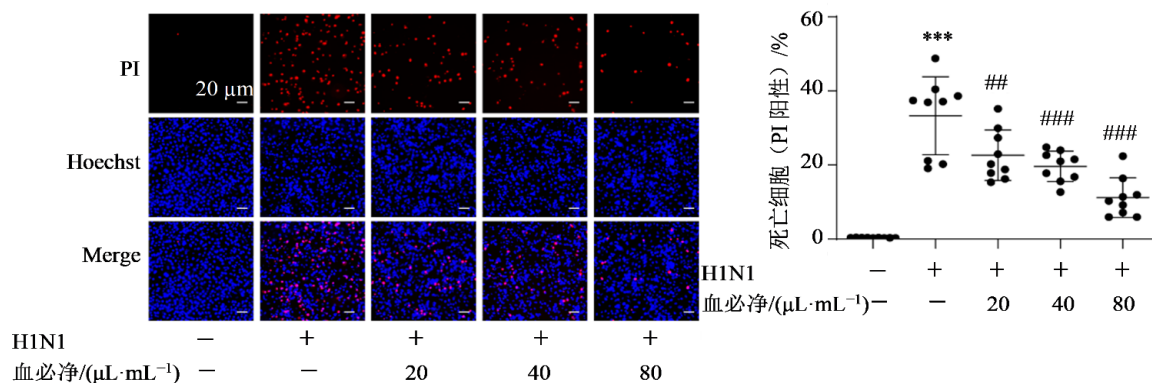


图3 qRT-PCR检测血必净对VSV-eGFP、HSV-1和H1N1复制的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

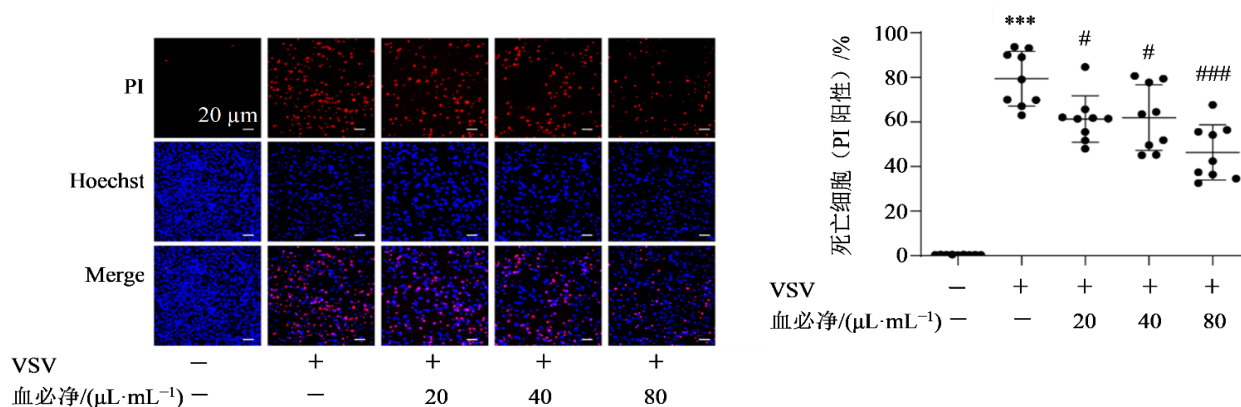
Fig. 3 Effect of Xuebijing on replication of VSV-eGFP, HSV-1, and H1N1 by qRT-PCR analysis ($\bar{x}\pm s, n=3$)



与对照组比较:*** $P<0.001$;与模型(病毒感染)组比较:## $P<0.01$ ### $P<0.001$
*** $P<0.001$ vs control group; ### $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model (viral infection) group

图4 PI染色检测血必净对H1N1诱导A549细胞死亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of Xuebijing on H1N1 induced cell death of A549 detected by PI staining ($\bar{x}\pm s, n=3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型(病毒感染)组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model (viral infection) group
 图5 PI染色检测血必净对VSV诱导A549细胞死亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of Xuebijing on VSV induced cell death of A549 detected by PI staining ($\bar{x} \pm s, n=3$)

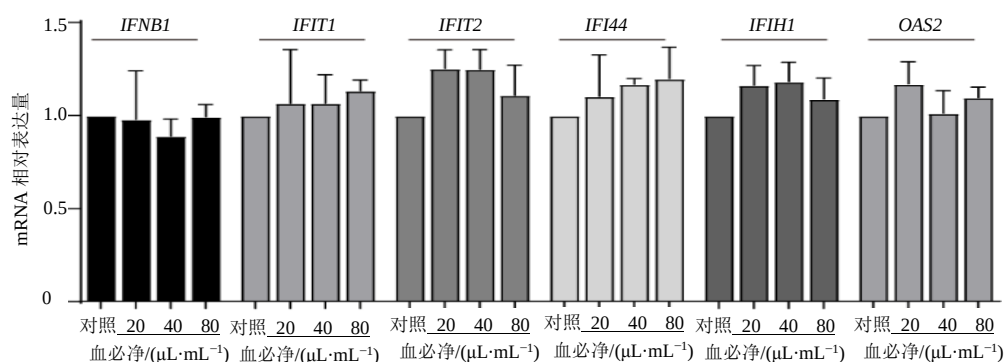


图6 qRT-PCR检测血必净对A549细胞IFNB1及ISGs相关基因mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of Xuebijing on mRNA expression of IFNB1 and ISGs related gene in A549 cells by qRT-PCR analysis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

poly(I:C)是一种病毒核酸类似物,其转染进入细胞后能与模式识别受体结合,激活抗病毒天然免疫信号通路,促进干扰素基因的表达。如图7所示,发现A549细胞转染poly(I:C)后,IFNB1及ISGs相关基因的表达明显上调($P < 0.001$),加入血必净($80 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理12 h后,IFNB1 mRNA水平无明显变化($P > 0.05$),而ISGs相关基因的表达水平显著降低($P < 0.05, 0.01$)。

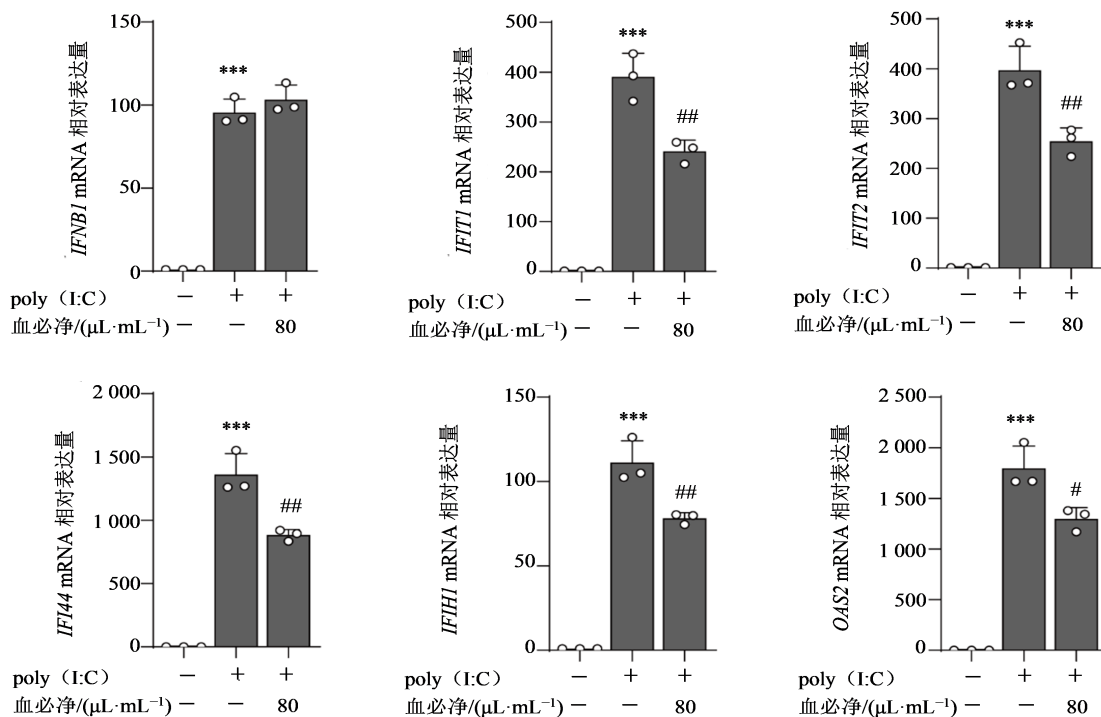
3.5 血必净注射液对病毒引起的炎症反应的影响

为了分析血必净对病毒诱发的炎症反应的影响,通过qRT-PCR分析了VSV-eGFP感染A549细胞12 h后促炎细胞因子基因(IL1B、IL6、TNFA)的表达水平。结果显示(图8),与对照组相比,病毒感染显著诱导相关促炎细胞因子的基因表达($P < 0.01, 0.001$)。与病毒感染组相比,血必净($80 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理后,细胞内的IL1B、IL6、TNFA的基因表达水平均

显著降低($P < 0.05, 0.01$)。此外,如图9所示,血必净($80 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)也能显著抑制HSV-1感染MEF细胞所诱发IL1b、IL6、Tnf mRNA表达的升高($P < 0.05, 0.001$)。

4 讨论

病毒引起的疾病,具有强烈的传染性和流行性^[10],中医药自古以来便积累了丰富的瘟疫诊疗经验,形成了辨证论治的独特优势,在抗击新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情中发挥巨大作用^[11]。血必净由红花、赤芍、川芎、丹参、当归5种中药提取物共同组成,具有“菌、毒、炎”并治的特点;目前临床上与抗生素联合用于治疗脓毒症^[12]和MODS,其主要机制被认为可能与抑制炎症因子^[2]、调节免疫^[4,13-14]等功能有关。由于血必净的成分复杂,其治疗脓毒症的物质基础目前尚未完全阐明,但已有研究显示,芍药苷和羟基红花黄色素A可能是其发挥

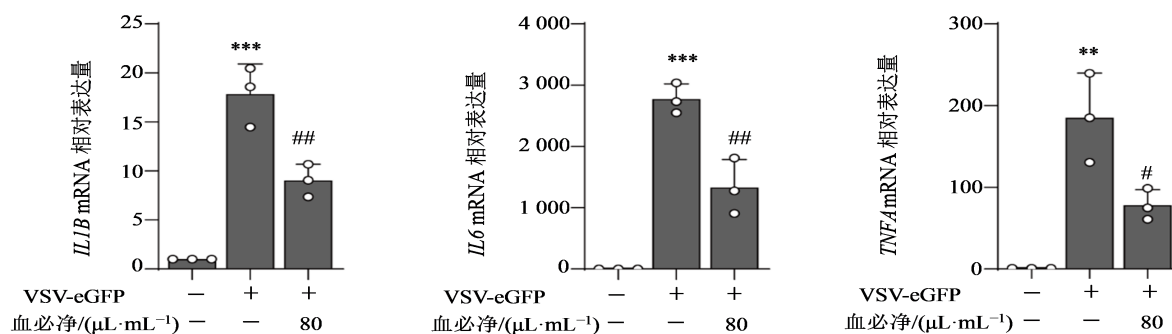


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与 poly(I:C) 刺激组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs poly(I:C) stimulating group

图7 qRT-PCR检测血必净对poly(I:C)刺激A549细胞 $IFNB1$ 及ISGs相关基因mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of Xuebijing on mRNA expression of $IFNB1$ and ISGs related gene in A549 cells stimulated with poly (I:C) by qRT-PCR analysis ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型(病毒感染)组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

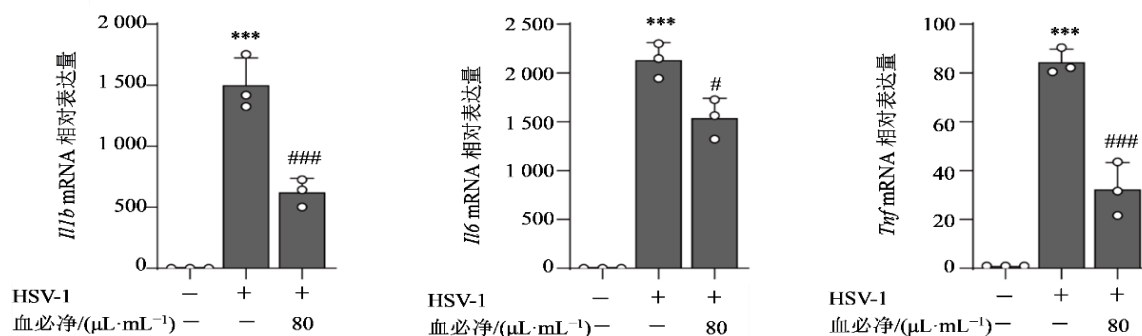
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model (viral infection) group

图8 qRT-PCR检测血必净对VSV-eGFP诱导的A549细胞促炎细胞因子mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of Xuebijing on mRNA expression of proinflammatory cytokines in A549 cells induced with VSV-eGFP by qRT-PCR analysis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

功能的主要成分^[3]。此外,临床研究发现,常规治疗联合血必净能降低COVID-19患者病死率,明显改善重症COVID-19患者的PSI的风险评级和临床预后^[6-7]。因此,血必净被《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)》列为重症及危重症COVID-19患者的推荐用药^[8]。最新的研究发现,血必净在Vero细胞中能抑制新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的复

制,并减少病毒空斑的形成^[7]。Vero细胞是非洲绿猴肾细胞系,研究表明该细胞中的抗病毒天然免疫信号通路相关基因表达不足或缺失,可能不利于血必净抗病毒效应与机制的研究。因此,本研究建立了多种病毒感染A549及MEF的细胞感染模型,发现血必净在体外具有抑制VSV、H1N1、HSV-1病毒复制的功能。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型(病毒感染)组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$
 *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model (viral infection) group

图9 qRT-PCR检测血必净对HSV-1诱导的MEF细胞促炎细胞因子mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of Xuebijing on mRNA expression of proinflammatory cytokines in MEF cells induced with HSV-1 by qRT-PCR analysis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

病毒感染宿主细胞后,可诱发宿主细胞死亡,如寨卡病毒(ZIKV)感染后,诱导外周神经元细胞死亡^[15];VSV通过M蛋白在细胞有丝分裂期间诱导细胞死亡^[16];西尼罗河病毒(WNV)能诱导中枢神经系统细胞死亡^[17]。研究表明,病毒诱发的宿主细胞死亡,是诱发“炎症因子风暴”和系统性炎症反应的重要诱因^[18]。以SARS-CoV-2为例,COVID-19患者的病毒感染部位伴随着NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎症小体的过度激活和细胞焦亡,最终导致IL-1 β 、IL-6和IL-17等促炎细胞因子的过度表达^[19]。而抑制病毒诱导的细胞死亡是抑制病毒感染及过度炎症反应的重要方式。已有研究证明,血必净对COVID-19的临床治疗作用,可能与其抑制病毒诱导的细胞死亡相关^[7]。本研究中发现,血必净在细胞水平发挥抗病毒作用的同时,有效抑制病毒诱导的细胞死亡,并减少IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子的基因表达,从而抑制病毒诱导的过度的炎症反应。

IFN通路在机体发挥抗病毒作用中起着至关重要的作用^[9]。DNA病毒或RNA病毒通过相应的模式识别受体产生IFN后,IFN分泌到细胞外,结合细胞表面IFN受体,进而激活JAK1和TYK2,诱导STAT1和STAT2的磷酸化;磷酸化STAT1/2组成的异源二聚体与干扰素调节因子9(IRF9)结合形成干扰素刺激基因因子3(ISGF3)复合物,该复合体进入细胞核促进ISGs的转录,产生抗病毒效应蛋白,例如IFIT、MX、OAS等^[9,19-23]。本研究结果表明,血必净单独处理不影响IFNs及ISGs的表达,并且对poly(I:C)刺激产生的IFN无显著影响,这表明血必

净对IFN上游通路可能无促进或抑制作用;但是血必净能够抑制poly(I:C)刺激的多种ISGs的表达,这提示血必净发挥抗病毒作用机制可能不依赖IFN信号通路。

本研究结果血必净在细胞水平具有抗多种病毒复制的功能,其通过抑制病毒诱导的细胞死亡和下调促炎细胞因子基因表达抑制病毒诱导的炎症反应,为血必净抗病毒感染的临床应用提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang P, Song Y L, Liu Z, et al. Xuebijing injection in the treatment of severe pneumonia: Study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2016, 17(1): 142.
- [2] Xu Q L, Liu J X, Guo X H, et al. Xuebijing injection reduces organ injuries and improves survival by attenuating inflammatory responses and endothelial injury in heatstroke mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 4.
- [3] Wang X T, Peng Z, An Y Y, et al. Paeoniflorin and hydroxysafflor yellow A in Xuebijing injection attenuate sepsis-induced cardiac dysfunction and inhibit proinflammatory cytokine production [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 614024.
- [4] Chen X, Feng Y X, Shen X Y, et al. Anti-sepsis protection of Xuebijing injection is mediated by differential regulation of pro- and anti-inflammatory Th17 and T regulatory cells in a murine model of polymicrobial sepsis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 211: 358-365.
- [5] Li C Y, Wang P, Li M, et al. The Current evidence for the

- treatment of sepsis with Xuebijing injection: Bioactive constituents, findings of clinical studies and potential mechanisms [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113301.
- [6] 刘学松, 宋元林, 关伟杰, 等. 血必净注射液治疗重症新型冠状病毒肺炎的多中心前瞻性队列研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021(7): 774-778.
- Liu X S, Song Y L, Guan W J, et al. A multicenter prospective cohort study of Xuebijing injection in the treatment of severe coronavirus disease 2019 [J]. *Chin Crit Care Med*, 2021(7): 774-778.
- [7] Ma Q H, Qiu M S, Zhou H X, et al. The study on the treatment of Xuebijing injection (XBJ) in adults with severe or critical *Corona* Virus Disease 2019 and the inhibitory effect of XBJ against SARS-CoV-2 [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105073.
- [8] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第九版) [EB/OL]. (2022-03-14) [2022-05-07]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-03/15/content_5679257.htm.
- National Health Commission of the People's Republic of China. Diagnosis and treatment of pneumonia caused by 2019 novel coronavirus (trial version 9) [EB/OL]. (2022-03-14) [2022-05-07]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-03/15/content_5679257.htm.
- [9] Ivashkiv L B, Donlin L T. Regulation of type I interferon responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(1): 36-49.
- [10] Collaborators G B D 2 D A I. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [11] Lyu M, Fan G W, Xiao G X, et al. Traditional Chinese medicine in COVID-19 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3337-3363.
- [12] 李 帅, 鹿 兴, 徐 磊. 血必净注射液治疗ICU脓毒症患者的临床观察 [J]. *中草药*, 2021, 52(12): 3656-3660.
- Li S, Lu X, Xu L. Clinical observation of Xuebijing Injection in treatment of ICU patients with sepsis [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2021, 52(12): 3656-3660.
- [13] Liu M W, Wang Y H, Qian C Y, et al. Xuebijing exerts protective effects on lung permeability leakage and lung injury by upregulating Toll-interacting protein expression in rats with sepsis [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1492-1504.
- [14] Wu Q, Yin C H, Li Y, et al. Detecting critical functional ingredients group and mechanism of Xuebijing injection in treating sepsis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 769190.
- [15] Oh Y, Zhang F R, Wang Y Q, et al. Zika virus directly infects peripheral neurons and induces cell death [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(9): 1209-1212.
- [16] Chakraborty P, Seemann J, Mishra R K, et al. Vesicular stomatitis virus inhibits mitotic progression and triggers cell death [J]. *EMBO Rep*, 2009, 10(10): 1154-1160.
- [17] Peng B H, Wang T. West Nile virus induced cell death in the central nervous system [J]. *Pathogens*, 2019, 8(4): 215.
- [18] Fajgenbaum D C, June C H. Cytokine storm [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(23): 2255-2273.
- [19] Li X D, Wu J X, Gao D X, et al. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects [J]. *Science*, 2013, 341(6152): 1390-1394.
- [20] Liu G Q, Gack M U. Distinct and orchestrated functions of RNA sensors in innate immunity [J]. *Immunity*, 2020, 53(1): 26-42.
- [21] Hajishengallis G, Lambris J D. Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(3): 187-200.
- [22] Seth R B, Sun L J, Ea C K, et al. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3 [J]. *Cell*, 2005, 122(5): 669-682.
- [23] Darnell J E, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins [J]. *Science*, 1994, 264(5164): 1415-1421.

[责任编辑 刘东博]