

基于 microRNAs 的石荠苎总黄酮抗流感病毒性肺炎作用机制研究

吴方¹, 余陈欢², 俞文英², 胡毅翔², 王丹仙¹, 俞冰^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江省医学科学院 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 浙江 杭州 310013

摘要: 目的 从微小核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) 角度研究石荠苎总黄酮抗流感病毒性肺炎作用机制。方法 设立对照组、模型组和石荠苎总黄酮组, 将甲型流感病毒小鼠肺适应株 A/PR/8/34 经鼻滴入模型组和石荠苎总黄酮组小鼠, 建立小鼠流感病毒感染性肺炎模型, 观察比较石荠苎总黄酮对流感病毒感染小鼠肺指数和血清白细胞介素-6 (IL-6)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 水平的影响; 采用高通量测序法和荧光定量 PCR 法, 检测各组小鼠肺组织中 miRNAs 的表达丰度差异; 采用 miranda、mirbase、targetscan 3 个数据库预测差异 miRNAs 的靶基因, 并通过 KEGG 分析靶基因的相关功能; 采用蛋白印迹法验证相关蛋白的表达。结果 与模型组相比, 石荠苎总黄酮可显著抑制流感病毒感染引起的小鼠肺指数和血清中细胞因子增加, 调节异常表达的 miRNAs 水平趋于正常; KEGG 分析这些 miRNAs 所调控的靶基因主要富集于 JAK-STAT、TLR3 等信号通路; Western blotting 证实石荠苎总黄酮可调整感染小鼠异常表达的靶蛋白水平。结论 石荠苎总黄酮可通过调控小鼠体内 miRNAs 的表达发挥抗流感病毒性肺炎作用。

关键词: 石荠苎总黄酮; 流感病毒; 靶基因; TLR3; 高通量测序

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)07-1149-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.015

Mechanism of total flavonoids from *Mosla scabra* on resistance to influenza viral pneumonia based on microRNAs

WU Fang¹, YU Chen-huan², YU Wen-ying², HU Yi-xiang², WANG Dan-xian¹, YU Bing¹

1. Pharmacy College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animal and Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of flavonoids from *Mosla scabra* (FMS) on anti-influenza from the sight of microRNAs. **Methods** Mice were divided into normal group, model (MC) group, and FMS group. Mice in MC and FMS groups were infected with influenza virus H1N1, then mice in the FMS group were treated with FMS. To observe the influence of mice in FMS group for the lung index and the levels of cytokines in serum. The difference expressing of miRNAs in lung tissue of mice in each group were detected by high-flux sequencing and quantitative real-time PCR. Human mRNA database as target was used to predict the target genes of differentially expressed miRNAs by miranda, mirbase, and targetscan analysis, while the target genes functions were considered by KEGG analyses. The related proteins of target genes were tested by Western blotting. **Results** FMS could significantly decrease the lung index and cytokines of infected mice and regulate the expression levels of abnormal miRNAs tend to normal. We also found that miRNAs are relevant to JAK-STAT and TLR3 signal pathways by KEGG. Western blotting confirmed that FMS could adjust the abnormal protein level of infected mice. **Conclusion** FMS obviously alleviates viral pneumonia via regulating miRNA expression in mice.

Key words: total flavonoids from *Mosla scabra*; influenza virus; target gene; TLR3; high-throughput sequencing

流行性感 冒 (流 感) 是 由 流 感 病 毒 感 染 引 起 的 常 见 呼 吸 道 急 性 传 染 病, 在 全 球 曾 发 生 多 次 大 流 行, 造 成 数 百 万 人 死 亡^[1]。 由 于 流 感 病 毒 的 变 异 性 强,

特 异 针 对 性 的 化 学 药 品 极 易 产 生 耐 药 性 和 副 作 用, 难 以 满 足 临 床 防 治 需 求。 而 中 药 抗 病 毒 疗 效 显 著, 不 良 反 应 少, 具 有 多 组 分、 多 靶 点 作 用 特 点, 对 防

收稿日期: 2015-09-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202977); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY14H280007, LQ15H28007)

作者简介: 吴方 (1989—), 男, 湖南岳阳人, 硕士研究生在读, 研究方向为中药资源开发与利用。Tel: (0571)88215491 E-mail: hnwufang@163.com

*通信作者 俞冰 (1972—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药资源开发与利用。Tel: (0571)88215491 E-mail: Jellycook2002@163.com

治流感具有独特优势^[2]。

石芥苧 *Mosla scabra* (Thunb.) C. Y. Wu et H. W. Li 为唇形科 (Labiatae) 植物, 为江浙地区常用中草药, 在我国分布广泛、资源丰富, 具有清热解毒、理气化痰的功效, 主治流行时疫、痰湿内蕴、疮毒和慢性支气管炎等症。前期研究发现石芥苧水提取物以及从石芥苧中分离得到的黄酮类化合物均具有较好的抗流感病毒效果^[3-5]。

微小核糖核酸 (microRNAs, miRNAs) 是近年来发现的一类由 20~24 个核苷酸组成的非编码 RNA, 其可通过与靶基因的 mRNA 互补结合, 在转录后水平调节 mRNA 的翻译, 来抑制靶基因的表达, 参与人体代谢、免疫、肿瘤等生理病理进程^[6]。Choi 等^[7]的研究发现, 小鼠感染流感病毒后, 体内 miRNAs 的表达平衡会遭到破坏; 而以 miRNA 为治疗靶点, 使之重新恢复正常平衡, 则可降低流感病毒造成的小鼠死亡率。miRNAs 的正常表达, 影响着流感疾病的发展过程; 而抗流感药物是否通过调整 miRNAs 的正常表达起到抗流感作用的研究未见报道。本研究通过高通量测序法, 观察和验证石芥苧总黄酮对流感病毒感染模型小鼠肺组织中 miRNAs 表达丰度的影响; 基于 miRNAs 角度, 通过生物信息学方法, 探讨石芥苧总黄酮所能涉及的信号通路, 进而阐明石芥苧总黄酮抗流感病毒性肺炎的可能机制, 为新药研发提供依据。

1 材料

1.1 实验动物和病毒株

雄性 ICR 小鼠, 清洁级, 体质量 18~22 g, 由浙江省实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。

甲型流感病毒小鼠肺适应株 A/PR/8/34(H1N1), 由浙江省疾病预防控制中心病毒所提供; 10 日龄 SPF 级鸡胚, 由浙江省农业科学院提供。实验在浙江省医学科学院 ABSL2 生物安全实验室进行。

1.2 药品与试剂

石芥苧全草采自浙江省临安市西天目山, 经浙江中医药大学中药资源教研室张水利教授鉴定为石芥苧 *Mosla scabra* (Thunb.) C. Y. Wu et H. W. Li 干燥全草。石芥苧总黄酮由浙江省医学科学院药物所提取制备, 并进行质控^[8]。RNA 质检试剂盒 (Agilent, 美国); 动物 RNA 纯化试剂盒 (LC Science, 美国); Trizol reagent (Invitrogen, 美国); 高通量测序试剂盒 (Illumina, 美国)。白细胞介

素-6 (IL-6)、 γ 干扰素 (IFN- γ) 试剂盒 (上海拜沃生化科技有限公司)。

1.3 实验仪器

ClassII Type/A/B2 生物安全柜 (Baker, 美国); Hiseq 2500 高通量测序仪 (Illumina, 美国); Bioanalyzer 2100 生物分析仪 (Agilent, 美国); Qubit 2.0 核酸定量仪 (Life technologies, 美国); 荧光定量 PCR 仪、ChemiDoc XRS+ 化学发光凝胶成像系统 (BIO-RAD, 美国)。

2 方法

2.1 病毒增殖

取 5 枚 10 日龄鸡胚, 照检, 在气室与胚胎面交界处避开血管做一标记。用 75% 酒精消毒标记及周围, 并在标记处用钻蛋机小心钻一小孔。用注射器吸取 0.15 mL 流感病毒液, 45 度角刺入壳膜少许注入病毒液, 用石蜡封口, 置 37 °C 恒温箱孵育 72 h。收获前将鸡胚置 4 °C 冰箱过夜, 使鸡胚死亡, 血液凝固。取出鸡胚, 用无菌镊子撕破鸡胚气室蛋壳, 移液管吸取鸡胚尿囊液置于冻存管分装, 备用。

2.2 实验分组和造模

90 只 ICR 小鼠, 按体质量从中随机分出 30 只作为对照组, 将剩余 60 只小鼠采用乙醚轻度麻醉, 以 10 倍 LD₅₀ 流感病毒滴鼻感染小鼠, 每只 20 μ L。小鼠出现体质量减轻、活动减少、耸毛等感染状态即说明造模成功。将造模成功后的小鼠, 按体质量随机分为模型组和石芥苧总黄酮给药组, 每组 30 只。

2.3 给药

取石芥苧总黄酮冻干粉, 以 10% 聚山梨酯-80 溶液溶解, 配制成溶液。石芥苧总黄酮组每次按照 150 mg/kg (按提取物中总黄酮量换算, 相当于临床成人常用剂量) 给药, 对照组和模型组给予等体积的 10% 聚山梨酯-80 溶液, 各组于造模前预先 ig 给药 3 d, 造模后继续给药 5 d 至实验结束。

2.4 样本采集和处理

各组小鼠于造模第 1、3、5 天, 给药后 2 h, 随机取 10 只小鼠摘眼球放血处死 (处死前 12 h 禁食不禁水)。留取各组小鼠血液, 分离血清, 检测细胞因子 IL-6、IFN- γ 水平。处死小鼠迅速解剖, 摘取小鼠肺组织, 生理盐水冲洗, 吸干表面水分, 称质量, 计算肺指数, 即肺质量与体质量比值。

同上述条件, 取造模第 5 天的小鼠肺组织样品, 置 -80 °C 保存备用。

2.5 miRNAs 的高通量测序、筛选及验证

按照 RNA 提取试剂盒说明, 提取造模第 5 天的 小鼠肺组织总 RNA, 凝胶电泳纯化长度为 18~30 nt 的 sRNA, 经 cDNA 合成、PCR 扩增后, 依据 Illumina 高通量测序试剂盒的要求操作, 进行高通量测序分析^[9]。根据测序结果分析处理, 滤去非目标序列, 对 照组、石芥苧总黄酮组分别与模型组进行比较, 筛 选 Absolute Fold change [$\log_2(A \text{ 组}/B \text{ 组})$] 为 2.0 倍 以上的 miRNAs; 并采用实时荧光定量 PCR 技术^[10], 检测各组小鼠肺组织中差异表达 miRNAs 的丰度。

2.6 靶基因预测及分析

采用 miranda、mirbase 和 targetscan 3 个数据库对 Absolute Fold change 超过 2.0 倍的 miRNAs 的靶基因 进行预测, 最终取预测结果的交集作为目标 miRNAs 的靶基因; 采用 cytoscape 软件, 结合以上信息, 构 建网络关系图; 应用 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) 对靶基因进行信号通路分析。

2.7 Western blotting 检测小鼠肺组织相关蛋白的 表达

取各组小鼠肺组织样本适量, 加入蛋白提取试 剂, 4 °C 匀浆, 冰浴裂解 30 min, 12 000 r/min 离 心 10 min, 收集上清, 即为肺组织总蛋白。采用考 马斯亮蓝法测定蛋白浓度。取 50 μg 总蛋白质在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转移至 PVDF 膜, 室 温 孵 育 1 h, 加 一 抗 4 °C 过 夜, TBS 溶 液 洗 膜 3 次, 再 加 入 HRP 标 记 的 二 抗 及 HRP 标 记 的 抗 生 物 素 抗 体, 室 温 孵 育 膜 1 h, TBS 溶 液 洗 膜 3 次; 洗 完 膜 稍 干 后, 加 入 AB 显 影 液, 在 化 学 发 光 成 像 仪 上 显 影, 计 算 目 的 蛋 白 与 内 参 蛋 白 β-actin 条 带 灰 度 的 比 值。

2.8 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计分 析软件进行统计学处理, 进行单因素方差分析, 多

重比较采用 LSD 法; 方差不齐采用非参数秩和检验。

3 结果

3.1 小鼠肺指数及细胞因子测定结果

各组小鼠肺指数测定结果见表 1, 在接种流感 病毒第 1 天, 可见各组肺指数差异不大, 无显著性 变化; 感染后第 3 天, 模型组与对照组相比, 肺指 数明显升高, 差异显著 ($P < 0.01$); 感染后第 5 天, 模型组肺指数显著高于对照组 ($P < 0.01$), 石芥苧 总黄酮组肺指数显著低于模型组 ($P < 0.05$); 说明 石芥苧总黄酮对流感病毒所致小鼠肺指数增加具 有一定抑制作用。小鼠血清中各时间点细胞因子 IL-6 和 IFN- γ 水平结果见图 1, 小鼠感染后第 1 天, 各 组细胞因子水平无显著差异; 感染第 3 天, 模型 组与对照组相比, IL-6 和 IFN- γ 水平显著升高 ($P < 0.05$), 石芥苧总黄酮组与模型组相比, IL-6 水平显 著降低 ($P < 0.05$), IFN- γ 水平显著升高 ($P < 0.05$); 感染后第 5 天, 模型组 IL-6 和 IFN- γ 水平显著高于 对照组 ($P < 0.01$), 同时, 石芥苧总黄酮组与模型 组相比, IL-6 和 IFN- γ 水平均得到抑制, 具有显著 差异 ($P < 0.05$ 、 0.01); 说明石芥苧总黄酮能够抑 制流感病毒所致的小鼠血清 IL-6 水平升高, 调节 IFN- γ 的水平。

表 1 石芥苧总黄酮对流感病毒感染小鼠肺指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of FMS on lung index of mice infected with influenza virus H1N1 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肺指数/(mg·g ⁻¹)		
		第 1 天	第 3 天	第 5 天
对照	—	62.4±2.7	62.5±2.8**	62.4± 2.8**
模型	—	66.5±2.9	97.5±7.1	128.8±15.9
石芥苧总黄酮	155	63.4±4.6	86.4±1.4	105.3± 2.0*

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

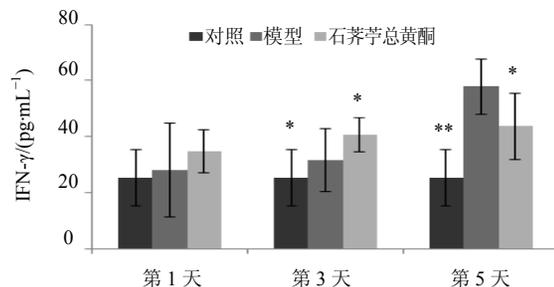
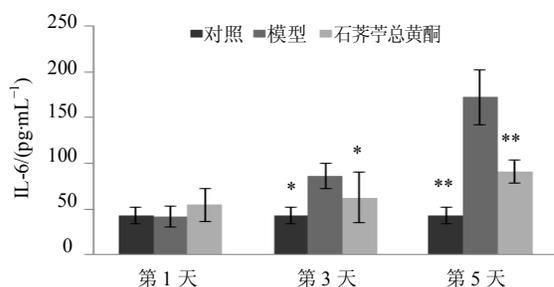


图 1 石芥苧总黄酮对流感病毒感染小鼠血清中 IL-6 和 IFN- γ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effects of FMS on cytokine levels of IL-6 and IFN- γ in serum of mice infected with influenza virus H1N1 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 miRNAs 表达情况变化

感染流感病毒后,小鼠肺组织中 miRNAs 表达变化同时满足 \log_2 (模型组/对照组) 和 \log_2 (模型组/石芥苧总黄酮组) 同为正值或同为负值,且绝对值大于 2.0 的差异 miRNAs 有 35 种,几个关键 miRNAs 表达情况见表 2。其中有 12 种 miRNAs 表达下调,且给予石芥苧总黄酮后,这些差异 miRNAs 的表达得到提升;有 23 种 miRNAs 的表达在感染流感病毒后升高,给予石芥苧总黄酮后,可以下调这些 miRNAs 的表达。说明石芥苧总黄酮对感染小鼠肺组织内 miRNAs 的表达,具有一定调整作用。

3.3 靶基因预测及功能分析

通过 miranda、mirbase 和 targetscan 3 个数据库对筛选出的差异 miRNAs 进行靶基因预测,得到 3 个数据库预测靶基因重叠部分的 452 个靶基因。

通过 cytoscape 软件绘制信号通路的 miRNAs-gene

调控网络图,如图 2 所示,以网络调控图中 miRNAs 所调控的基因数目,对调控网络中 miRNAs 进行等级 (degree) 评价,调控基因数目越多,等级越高。由图 2 可知,在调控网络图中,miRNA-449a-5p、miRNA-369-3p、miRNA-465-5p 为核心 miRNAs。

表 2 小鼠肺组织几个关键 miRNAs 表达差异情况
Table 2 Key difference of miRNAs expression in lung tissue of mice

miRNAs	倍数变化	
	模型/对照	石芥苧总黄酮/模型
miR-103-3p	-2.92	5.56
miR-107-3p	-2.53	5.50
miR-155-5p	6.94	-2.77
miR-449a-5p	-2.98	3.14
miR-369-3p	3.34	-4.65
miR-710	3.08	-3.10

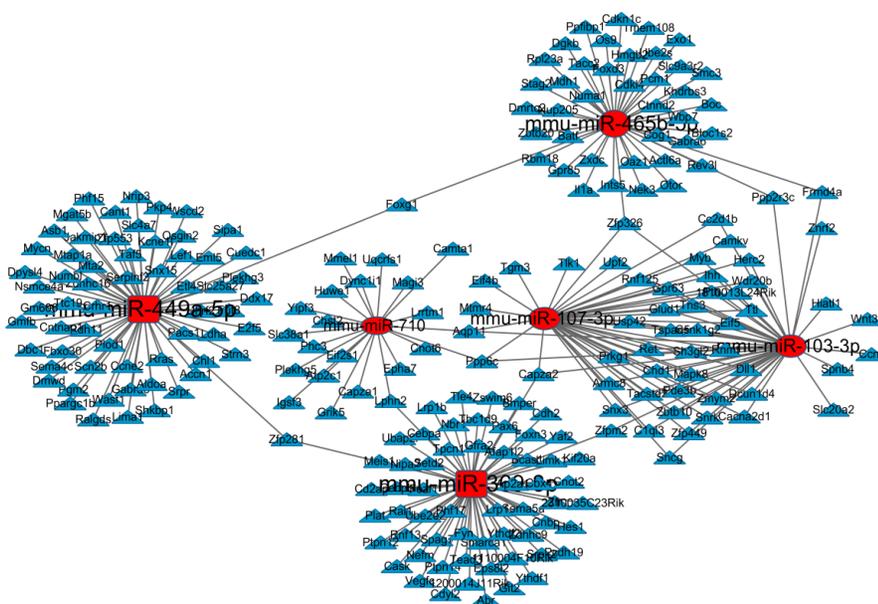


图 2 差异 miRNAs-gene 网络调控图

Fig. 2 Network diagram of differences of miRNAs-gene

KEGG 是经典的生化代谢路径数据库之一,包含 19 个高度相关的数据库^[11];通过 KEGG 通路分析富集评分,可构建相关基因的信号通路图。通过 DAVID 程序对上述差异 miRNAs 进行 KEGG 通路分析,预测靶基因富集的生物学通路^[12],发现上述差异 miRNAs 主要参与 JAK-STAT 通路、TLR3 信号通路、趋化因子等炎症相关信号通路(图 3)。其中,有背景标记的基因为数据库预测得到的石芥苧总黄酮诱导 miRNAs 可能作用的靶基因。

3.4 石芥苧总黄酮对相关蛋白表达的影响

根据 KEGG 通路分析结果,采用 Western blotting 法,对靶基因的表达情况进行验证,结果见图 4。与对照组相比,模型组中可见蛋白 TLR3、STAT3、p65 的表达显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01);而石芥苧总黄酮组的相关蛋白表达与模型组相比有降低的趋势,蛋白表达水平接近对照组。与对照组相比,PCDC4 的表达在模型组中有所降低 ($P < 0.05$),给予石芥苧总黄酮治疗后,可见其表达水平升高,证明石芥苧总黄酮诱导产生的 miRNAs 影响预测靶基因的蛋白表达。

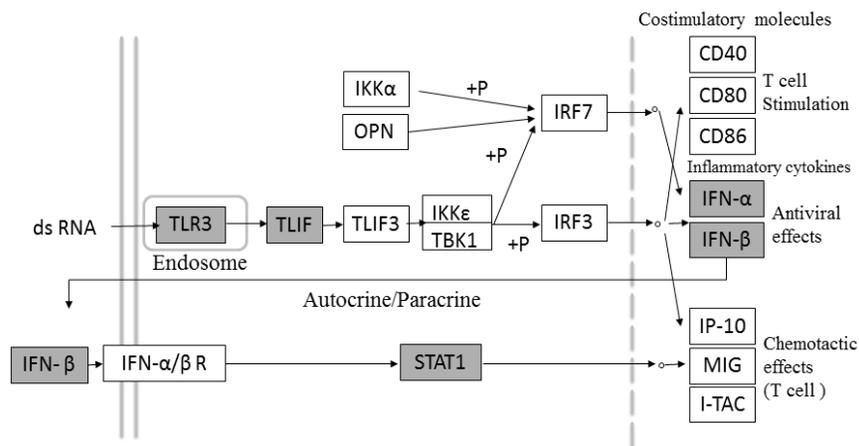


图 3 石芥苧总黄酮抗流感效应的 miRNAs/TLR3 调控通路

Fig. 3 miRNAs/TLR3 signal pathway of FMS with anti-influenza efficiency

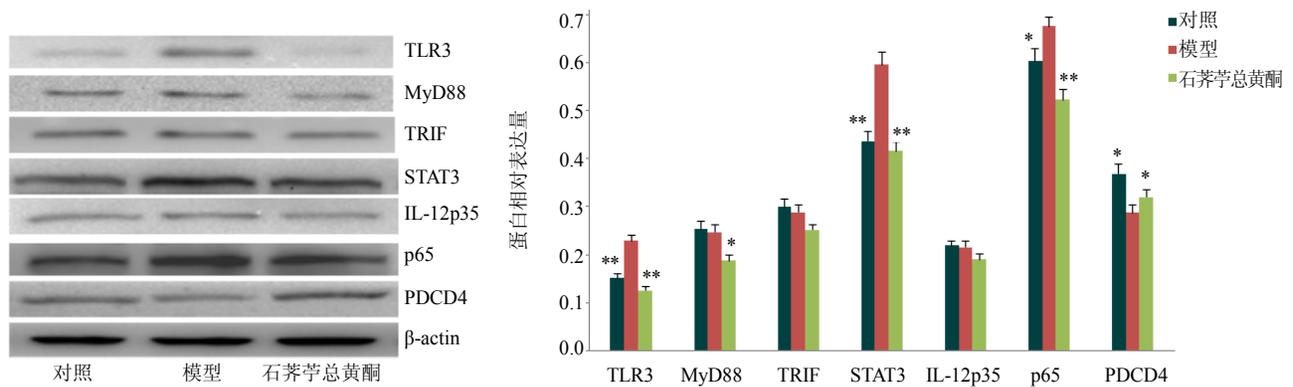


图 4 各组小鼠肺组织 TLR3 通路相关因子的蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Protein expression of related factors in TLR3 pathway in lung tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

现代医学研究表明，流感病毒侵入呼吸道后，在黏膜上皮细胞内复制、感染，刺激组织细胞产生免疫应答，释放免疫因子，而过度的宿主免疫反应，却引起了一系列的肺部病理性炎症损伤^[13]，这也是流感病毒感染导致死亡的重要原因。中药在抗流感方面有其独特优势，因其不仅能直接作用于病毒，抑制其增殖，更重要的是能够调节宿主免疫反应，减轻炎症病理损伤，大大减少流感病毒性肺炎的发生^[14]。黄酮类化合物是中药比较常见的有效成分之一，已有文献报道^[15]，黄酮类化合物具有抗炎、调节免疫活性，且其抗炎、调节免疫的活性主要表现在对炎症因子的调节上^[16]。前期研究^[17]发现石芥苧总黄酮可通过下调小鼠炎症信号，抑制脂多糖诱导的急性肺损伤。本研究也证实，石芥苧总黄酮可有效抑制流感病毒引起的小鼠肺水肿，减轻流感病毒

引起的炎症损伤。

miRNAs 在疾病的发生和发展过程中扮演着重要角色，与肺炎炎症反应、肺癌、肺纤维化等肺部疾病的发生和发展密切相关^[18]。本研究以小鼠构建流感病毒感染模型，通过高通量测序，发现流感病毒确能引起小鼠肺内 miRNAs 的异常表达，而给予石芥苧总黄酮治疗后，能够改善 miRNAs 异常表达的情况。Wang 等^[19]研究表明，miRNAs 或其靶基因参与调控了鸡对禽流感病毒感染的反应。近年来的研究证实，miRNAs 可通过靶向免疫系统中关键信号传导分子的表达，参与调控机体的免疫应答^[20]。将筛选出的差异 miRNAs 进行靶基因预测，并进行 KEGG 通路分析，发现其主要参与 JAK-STAT 通路、TLR3 信号通路、趋化因子等炎症相关信号通路；继而蛋白免疫印迹的结果证实，石芥苧总黄酮可有效抑制相关炎症信号通路关键蛋白的表达。因此，

推测石芥苧总黄酮有可能通过调节流感病毒感染小鼠体内 miRNAs 的表达, 而调控机体的免疫应答反应, 减少宿主免疫引起的肺损伤, 进而发挥抗流感病毒性肺炎的作用。

参考文献

- [1] Butler D. Caution urged for mutant flu work [J]. *Nature*, 2011, 481(7382): 417-418.
- [2] 李湘激, 刘叔文, 杨 洁. 茶黄素衍生物抗甲型流感病毒的作用研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(7): 2437-2441.
- [3] 余陈欢, 俞文英, 钟宇森, 等. 石芥苧属植物化学成分及药理活性研究概况 [J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(8): 1700-1704.
- [4] Wu Q F, Yu C H, Yan Y L, *et al.* Antiviral flavonoids from *Mosla scabra* [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(5): 429-433.
- [5] Yu C H, Yan Y L, Wu Q F, *et al.* Anti-influenza virus effects of the aqueous extract from *Mosla scabra* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(2): 280-285.
- [6] Schirle N T, Sheu-Gruttadauria J, MacRae I J. Structural basis for microRNA targeting [J]. *Science*, 2014, 346(6209): 608-613.
- [7] Choi E J, Kim H B, Baek Y H, *et al.* Differential microRNA expression following infection with a mouse-adapted, highly virulent avian H5N2 virus [J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14(1): 252.
- [8] 余陈欢, 藏家娜, 方 杰, 等. 石芥苧总黄酮的大孔树脂吸附纯化及其体外抑菌活性研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(7): 723-726.
- [9] Hammond S, Swanberg J C, Polson S W, *et al.* Profiling conserved microRNA expression in recombinant CHO cell lines using illumina sequencing [J]. *Biotechnol Bioengin*, 2012, 109(6): 1371-1375.
- [10] 许长娣, 梅娟娟, 李 丹, 等. microRNA 在卵清蛋白诱导的支气管哮喘小鼠模型中的表达 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(21): 1655-1657.
- [11] Sultana K Z, Bhattacharjee A, Jamil H. Querying KEGG pathways in logic [J]. *Inter J Data Min Bioinf*, 2014, 9(1): 1-21.
- [12] 方 杰, 胡毅翔, 应华忠, 等. 米碎花药效微小核糖核酸的鉴定及其靶基因功能分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(1): 80-85.
- [13] Kok W L, Denny L, Benam K, *et al.* Invariant NKT cells reduce accumulation of inflammatory monocytes in the lungs and decrease immune-pathology during severe influenza A virus infection [J]. *J Leuk Biol*, 2012, 91(3): 357-368.
- [14] 王羽依, 金叶智, 董莹莹, 等. 黄芩及其成分抗流感病毒感染的实验研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(27): 5365-5369.
- [15] González R, Ballester I, López-Posadas R, *et al.* Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation [J]. *Crit Rev Food Sci Nut*, 2011, 51(4): 331-362.
- [16] 刘 维, 孙 淳, 吴沅峰. 黄酮类中药单体成分治疗类风湿性关节炎作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(19): 2878-2882.
- [17] Chen J, Wang J B, Yu C H, *et al.* Total flavonoids of *Mosla scabra* leaves attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via down-regulation of inflammatory signaling in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(3): 835-841.
- [18] 王晓瞳, 谢 婷, 李翼飞, 等. MicroRNA 与肺部疾病 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2011, 31(5): 457-460.
- [19] Wang Y, Brahmakshatriya V, Lupiani B, *et al.* Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers [J]. *BMC Genomics*, 2012(13): 278-292.
- [20] 朱清源, 戈宝学. microRNA 与免疫调控 [J]. *现代免疫学*, 2011, 31(2): 89-92.