

香雪抗病毒口服液体外抗甲型流感病毒及炎症因子的作用机制研究

李杰婷^{1,2}, 陈俏连^{1,2}, 赵昕^{3,4}, 杨子峰^{1,2}, 王玉涛^{1,2*}

1. 广州呼吸健康研究院, 广东 广州 510000

2. 广州医科大学附属第一医院 呼吸疾病国家重点实验室, 广东 广州 510000

3. 广东省化学测量与应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510000

4. 广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心), 广东 广州 510000

摘要: **目的** 探讨香雪抗病毒口服液对甲型流感病毒的活性及其在炎症免疫应答中的潜在作用机制。**方法** 采用噻唑蓝(MTT)染色法检测香雪抗病毒口服液对 MDCK 细胞和 A549 细胞的细胞毒性作用。采用细胞病变抑制法(CPE)及空斑减少实验对香雪抗病毒口服液进行抗病毒活性检测。采用免疫荧光法检测 NP 蛋白。实时荧光定量 PCR 测定炎症细胞因子的表达情况。采用蛋白印迹实验检测香雪抗病毒口服液对炎症相关信号通路的蛋白表达的影响。**结果** 香雪抗病毒口服液对甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 和 A/Aichi/2/68 (H3N2) 均有一定的抗病毒抑制作用, 半数细胞毒性浓度(TC₅₀)分别为 42.12、79.36 mg/mL, 半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 8.665、5.260 mg/mL, 并可减少 H1N1 病毒空斑形成。香雪抗病毒口服液能呈剂量相关性地降低 H1N1 诱导的 A549 细胞炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、视黄酸(维甲酸)诱导基因蛋白 1 (RIG-I)、趋化因子(CC 基序)配体 5 (CCL5)、巨噬细胞炎症蛋白-1 β (MIP-1 β)、干扰素诱导蛋白-10 (IP-10)、白细胞介素-10 (IL-10)、 λ 干扰素 (IFN- λ)、 β 干扰素 (IFN- β)、白细胞介素-8 (IL-8) mRNA 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。在流感病毒单复制周期中, 香雪抗病毒口服液在早期阶段 0~2 h 干预, 具有良好的抗流感病毒效果。香雪抗病毒口服液能显著抑制 Toll 样模式识别受体 3 (TLR3)、RIG-I、黑色素瘤分化相关基因 5 (MDA-5) 受体的表达, 下调核转录因子- κ B 亚基 p65 (NF- κ B p65)、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、信号转导和转录激活因子 1 (STAT1)、STAT2、STAT3 的磷酸化水平, 且在 20 mg/mL 浓度下明显下调这些蛋白的表达。**结论** 香雪抗病毒口服液不仅能有效抑制甲流感病毒在人宿主细胞中复制, 降低流感病毒诱导的炎症因子表达, 而且能显著抑制流感病毒诱导天然免疫信号通路的相关蛋白表达, 表明香雪抗病毒口服液具有防治流感病毒的潜力。

关键词: 香雪抗病毒口服液; 甲型流感病毒; 抗病毒; 抗炎; 核因子- κ B 信号通路; Janus 激酶/信号转导与转录激活子信号通路

中图分类号: R978.7

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)09-2118-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.09.002

Mechanism of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid against influenza A virus and inflammatory factors *in vitro*

LI Jie-ting^{1,2}, CHEN Qiao-lian^{1,2}, ZHAO Xin^{3,4}, YANG Zi-feng^{1,2}, WANG Yu-tao^{1,2}

1. Guangzhou Institute of Respiratory Health, Guangzhou 510000, China

2. State Key Laboratory of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Measurement and Emergency Test Technology, Guangzhou 510000, China

4. Institute of Analysis, Guangdong Academy of Sciences (China National Analytical Center, Guangzhou), Guangzhou 510000, China

Abstract: Objective To investigate the activity of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid against influenza A virus, and its potential mechanism in inflammatory immune response. **Methods** Cytotoxic effects of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid on MDCK cells

收稿日期: 2023-02-07

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金资助项目(2020B1515120045)

作者简介: 李杰婷, 女, 硕士研究生, 研究方向为呼吸疾病中西医结合研究。E-mail: kitty_lee_e@163.com

*通信作者: 王玉涛, 男, 副研究员, 研究方向为中药抗流感病毒药理。E-mail: wang-yu-tao2008@163.com

and A549 cells were detected by MTT staining. Antiviral activity of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid was detected by cytopathic inhibition (CPE) and plaque reduction test. NP protein was detected by immunofluorescence method. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to determine the expression of inflammatory cytokines. Western blotting assay was used to detect the protein expression of antiviral and anti-inflammatory signaling pathway in Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid. **Results** Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid had certain antiviral inhibitory effect on influenza A virus A/PR/8/34 (H1N1) and A/Aichi/2/68 (H3N2), TC_{50} was 42.12 mg/mL and 79.36 mg/mL, respectively. IC_{50} was 8.665 mg/mL and 5.260 mg/mL, respectively, and reduced plaque formation of H1N1 virus. The expression of *TNF- α* , *RIG-I*, *CCL5*, *MIP-1 β* , *IP-10*, *IL-10*, *IFN- λ* , *IFN- β* , *IL-8* mRNA in A549 cells induced by H1N1 was decreased in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). In the single replication cycle of influenza virus, Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid has a good anti-influenza virus effect after 0 ~ 2 h intervention in the early stage. Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid can significantly inhibit the expression of TLR3, RIG-I, MDA-5 receptors. The phosphorylation levels of NF- κ B p65, I κ B α , STAT1, STAT2, and STAT3 were down-regulated, and the expression of these proteins was significantly down-regulated at 20 mg/mL. **Conclusion** Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid could not only effectively inhibit the replication of influenza A virus in human host cells, reducing the expression of inflammatory factors induced by influenza virus, but also significantly inhibit the related proteins of the innate immune signaling pathway induced by influenza virus, which indicated that Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid had the potential to prevent and treat influenza virus.

Key words: Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid; influenza A virus; antiviral; anti-inflammatory; NF- κ B signaling pathway; JAK-STAT signaling pathway

流感病毒是具有包膜的单链负链核糖核酸 (RNA) 病毒, 根据核衣壳蛋白 (NP) 和基质蛋白 (MP) 分为 A、B、C、D (甲、乙、丙、丁) 4 种类型^[1-2]。其中甲型流感病毒 (IAV) 可引起人畜共患呼吸道传染病, 对人类健康构成巨大威胁。据世界卫生组织估计, 季节性流感每年可导致 300~500 万人患上严重疾病, 每年可致 25~50 万人死亡^[3]。预防和控制流感最有效方法是接种疫苗和抗病毒药物^[4-5], 但病毒变异和耐药性使流感难以控制^[6]。因此, 迫切需要寻找新的抗病毒药物。

在我国中药用于预防和治疗流感已有数千年的历史, 在治疗流感具有多途径、多靶点、不良反应少且不易产生耐药的独特优势, 而被临床广泛应用。抗病毒口服液作为经典中药制剂, 临床用于流感、手足口病、上呼吸道感染、手足口病等疾病^[7]。全方由 9 味中药组成, 方中板蓝根清热解毒、凉血消肿、利咽散结, 连翘苦凉、清热解毒以祛邪, 二者共为君药。生石膏、知母甘寒清润, 消泻肺胃之热, 能增强君药清热之力为臣药; 广藿香芳香辛散、解表祛湿, 芦根清热解暑、生津止渴, 生地黄清热凉血生津, 石菖蒲芳香走窜、化湿祛痰, 郁金行气凉血利咽, 共为佐药; 共奏清热祛湿, 凉血解毒之效^[8]。现有药理应用和临床实验研究发现, 抗病毒口服液在体内可通过抑制炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 从而达到减轻肺部炎症的作用, 且可以提高 γ 干扰素 (IFN- γ) 的含量从而抑制病毒的复制。此外, 抗病毒口服液中的活性成分通过抑制线粒体

融合素基因 2 (Mfn2) 的表达以增强线粒体抗病毒信号蛋白 (MAVS) 抗病毒信号通路促进 β 干扰素 (IFN- β) 的分泌, 抑制流感病毒的复制, 同时通过下调核因子- κ B (NF- κ B) 抑制炎症反应, 从而降低应激小鼠对流感病毒的易感性^[9-15]。中药制剂由于现代工艺提取及遣方用药的配比不同, 导致药效不同, 而抗病毒口服液是基于原有的中药成分, 进行了新的配比研发得来。本研究主要探讨了香雪抗病毒口服液体外抗流感病毒活性及其调节流感病毒诱导的炎症反应作用, 以及在体外靶向宿主信号通路的潜在作用机制。

1 材料

香雪抗病毒口服液浸膏 (规格 0.352 g 生药/mL, 批号 20210129) 购自广州市香雪制药股份有限公司; 磷酸奥司他韦 (批号 20200308) 购自南京康南林化工实业有限公司。以 (R,S)-告依春、连翘酯苷 A、连翘苷作为对照品对抗病毒口服液进行 HPLC 测定, 每 1 g 含 (R,S)-告依春 73.58 μ g, 连翘酯苷 A 890.94 μ g, 连翘苷 3 544.06 μ g。取 351.50 g 该浸膏作为药效研究样品, 每 1 g 香雪抗病毒口服液浸膏含 1.22 g 生药材, 每 1 mL 抗病毒口服液含本浓缩液 0.352 g。

狗肾细胞系 (MDCK) 和人肺癌上皮细胞系 (A549) 均引自美国典型培养物保藏委员会细胞库 (ATCC)。2 种细胞采用 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco 公司) 培养。

甲型流感病毒 A/PR/8/34 (H1N1) 和 A/Aichi/

2/68 (H3N2) 均购自 ATCC, 依照标准病毒培养方法扩增保存。病毒滴度通过观察细胞病变效应 (CPE) 并采用 Reed-Muench 法计算半数组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 表示。

2 方法

2.1 细胞毒性实验

采用噻唑蓝 (MTT) 染色法检测香雪抗病毒口服液对 MDCK 细胞和 A549 细胞的细胞毒作用。将生长密度适度的细胞接种到 96 孔培养板中, 24 h 后汇成单层细胞。加入 DMEM 配制的香雪抗病毒口服液 (1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 mg/mL) 培养液加入细胞培养板中, 48 h 后去上清并用含 0.5 mg/mL MTT 的 PBS 溶液温育细胞 4 h; 弃上清并加入二甲基亚砷 (DMSO) 溶解活细胞内甲瓚晶体。使用 Multiskan Spectrum 酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司) 测定 490 nm 处的吸光度 (A)。根据 A 值计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}})$$

将细胞存活率及对应药物浓度用 GraphPad Prism 建立曲线, 进行非线性回归方程 (曲线拟合) 并计算出药物的半数细胞毒性浓度 (TC₅₀) [16]。

2.2 体外抗病毒活性实验

以细胞病变抑制法对待测药物进行抗病毒活性检测。在 96 孔板细胞长至单层后, 接种 100 个 TCID₅₀ 病毒液 (100 μL/孔), 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h 后, 弃去病毒液, 将 DMEM-F12 培养基 (含 1.5 μg/mL TPCK 处理的胰蛋白酶) 配制不同质量浓度 (1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 mg/mL) 香雪抗病毒口服液、阳性对照药物奥司他韦 (1.562 5、3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L), 加入培养板中, 48 h 后观察并记录致细胞病变效应 (CPE)。采用 Reed-Muench 法计算半数有效浓度 (IC₅₀), 选择指数 (SI) = TC₅₀/IC₅₀。SI 判断标准: SI < 1 表示无效; SI 为 1~2 表示高毒低效; SI > 2 表示低毒高效 [16]。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{药物组}} - A_{\text{病毒组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{病毒组}})$$

$$\text{IC}_{50} = \text{Antilog}[B + (50 - B) / (A - B)] \times C$$

A = log (抑制率 > 50% 药物浓度); B = log (抑制率 < 50% 药物浓度); C = log 稀释倍数

2.3 空斑减少实验

用 MOI = 0.05 的 H1N1 病毒感染 6 孔板中的单层 MDCK 细胞, 分别设置 H1N1 感染组、香雪抗病毒口服液 (5、10、20 mg/mL) 组 (在香雪抗

病毒口服液体外抗病毒活性实验中, 已测得 IC₅₀ = 8.665 mg/mL, 在此基础上, 选择接近 IC₅₀ 浓度, 低于 IC₅₀ 和高于 IC₅₀ 的 3 个浓度, 且呈梯度关系)。另设置对照组和非感染的香雪抗病毒口服液 20 mg/mL 组。

H1N1 病毒感染的 MDCK 细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱吸附 2 h; 换掉病毒液, 加入含香雪抗病毒口服液 (5、10、20 mg/mL) 的 0.8% 琼脂 (含 1.5 μg/mL TPCK 处理的胰蛋白酶) 覆盖细胞单层。H1N1 感染组和对照组加入等量培养液 (含 0.8% 琼脂 + 1.5 μg/mL TPCK 处理的胰蛋白酶); 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育, 48 h 后使用 10% 福尔马林固定并去除覆盖琼脂, 1% 结晶紫染色, 流水洗涤后计数斑块。

2.4 免疫荧光法检测抗流感时相实验

MDCK 细胞接种含小玻片培养板上, 弃去上清, 加入 MOI = 1 的 H1N1 病毒感染细胞, 4 °C 吸附 2 h, 各组别加入含 TPCK 酶的 DMEM 培养基。感染后 0、2、4、6 h 分别加入含 TPCK 酶的香雪抗病毒口服液 10 mg/mL, 同时设立对照组, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 8 h。然后取出玻片用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min; PBST 洗涤 3 次 (5 min/次), 加入 0.5% Triton X-100 通透 10 min, PBST 洗涤 3 次 (5 min/次), 加入 5% 羊血清封闭 30 min; 吸弃封闭液加入 H1N1 病毒 NP 蛋白的特异性抗体 (1:100, 用 1% 羊血清稀释), 置 4 °C 孵育过夜; 加入 FITC 标记二抗 (1:200, 用 1% 羊血清稀释), 室温 1 h, PBST 洗涤 3 次, 甘油封 (含细胞核染料) 在荧光显微镜下观察结果。

2.5 实时荧光定量 PCR 测定炎症细胞因子的表达

在 6 孔板 A549 细胞长至单层, 加入 MOI = 0.02 的 H1N1 流感病毒培养液 1 mL/孔作为模型组, 在模型组的基础上, 设置香雪抗病毒口服液 (0.25、2.5、25 mg/mL) 组, 另设置非 H1N1 感染的香雪抗病毒口服液 (25 mg/mL) 组和对照组。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中吸附 2 h 后, 弃去上清, 再加入含待测药物的 DMEM-F12 培养基, 24 h 后, 加入 TRIzol 试剂裂解各组细胞, 提取总 RNA。方法如下: 在各组别中加入 1 mL TRIzol/孔裂解细胞, 然后加入 0.2 mL 氯仿充分混匀; 室温静置 2 min, 12 000 r/min, 4 °C 离心 15 min。转移上清至 1.5 mL EP 管中, 按体积比加入异丙醇沉淀, 室温静置 10 min, 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 弃去上清。

然后加入 1 mL 75%酒精 4 °C、7 500×*g* 离心 5 min 弃上清；再加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA，测定 RNA 浓度并用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒（TaKaRa Bio）进行逆转录。并采取 Tag Man Premix Ex Tap™ II（Takara Bio）对 cDNA 样品进行 RT-qPCR 检测。PCR 数据使用检测系统（ABI PRISM®7500 Real-time PCR system，美国 Applied Biosystems Co.）进行分析。PCR 产物的相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算^[17]，引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物探针序列

Table 1 Primers and probes sequences for RT-qPCR

基因	类型	序列 (5'—3')
CCL5	正向	CAGCAGTCGTCTTTGTCACC
	反向	GTTGATGTACTCCCGAACCC
	探针	CGCCAAGTGTGTGCCAACCC
TNF-α	正向	AACATCCAACCTTCCCAAACG
	反向	GACCCTAAGCCCCCAATTCTC
	探针	CCCCCTCCTTCAGACACCCTCAACC
IP-10	正向	GAAATTATTCCTGCAAGCCAATTT
	反向	TCACCCTTCTTTTTCAT-TGTAGCA
	探针	TCCACGTGTTGAGATCA
MIP-1β	正向	AAAACCTCTTTGCCACCAATACC
	反向	GAGAGCAGAAGGCAGCTACTAG
	探针	TGAAGCTCTGCGTGACTGTCTGTCT
RIG-I	正向	GATGCTCTGGATTACTTG
	反向	GTGGTACTCTTCTTGTAAG
	探针	CTTCTTCAGCAATGTCCGAGCAG
IL-8	正向	CTTGTTTCTCCTTTATTCTA
	反向	GCACAAATATTTGATGCTTAA
	探针	TTAGCCACCATCTTACCTCACAGT
IL-10	正向	GGGTACATTATGGAGGCTTTCTCA
	反向	GAGGACGCTGTCTTTGCATAGG
	探针	TCTGCCACTTTCACTGCTTTTACCCCA
GAPDH	正向	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	反向	GAAGATGGTGATGGGATTC
	探针	CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC

2.6 蛋白印迹实验检测信号通路蛋白表达

A549 细胞接种 6 孔板中培养 24 h 长至单层，分别设置对照组、H1N1 病毒感染的模型组、香雪抗病毒口服液（5、10、20 mg/mL）组以及非 H1N1 感染的香雪抗病毒口服液 20 mg/mL 组。首先用 PBS 洗涤细胞，加入 MOI=0.1 的 H1N1 病毒感染 A549 细胞，37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 2 h，弃病毒上清

液，按设置组别加入相应培养基。24 h 后使用预冷 PBS 洗涤细胞 1 次，加入适量的 RIPA 裂解液裂解细胞、提取总蛋白；采用 BCA 试剂盒（Beyotime，中国）检测样品的蛋白浓度。取定量的蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳；使用 BIO-RAD 的半干转或湿转法将蛋白条带转至 PVDF 膜上，5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h；4 °C 孵育对应抗体过夜，次日使用 TBST 洗涤 PVDF 膜并室温孵育相应二抗，TBST 洗涤 3 次后加入 ECL 发光液，使用化学发光成像仪进行曝光，获得目的蛋白条带。

2.7 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析，GraphPad Prism 9 软件做图，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），如果差异有统计学意义，则进行组间 LSD 检验。

3 结果

3.1 香雪抗病毒口服液的细胞毒性和抗流感活性

香雪抗病毒口服液对 MDCK、A549 细胞的 TC₅₀ 分别为 42.12、79.36 mg/mL，见图 1。香雪抗病毒口服液对 MDCK 细胞的 H1N1 和 H3N2 毒株有一定的抑制作用，IC₅₀ 分别为 8.665、5.260 mg/mL，见表 2。

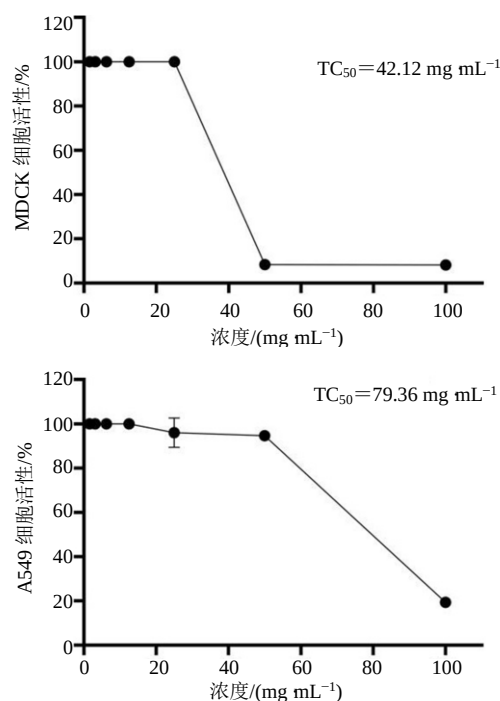


图 1 香雪抗病毒口服液对 MDCK 和 A549 细胞的细胞毒性 (n = 3)

Fig. 1 Effects of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid on viability of MDCK cell and A549 cell (n = 3)

表 2 香雪抗病毒口服液对流感病毒 H1N1 和 H3N2 的体外抑制作用

Table 2 Inhibitory effects of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid against influenza virus strains H1N1 and H3N2 *in vitro*

毒株	香雪抗病毒口服液 IC ₅₀ /(mg mL ⁻¹)	奥司他韦 IC ₅₀ / (μmol·mL ⁻¹)
H1N1	8.665	2.242
H3N2	5.260	3.970

此外,空斑减少实验结果如图 2 所示,与 H1N1 感染组相比,香雪抗病毒口服液 20 mg/mL 组可以有效抑制病毒斑块的形成。非感染的香雪抗病毒口服液 20 mg/mL 组不会引起炎症反应。结果表明香雪抗病毒口服液在体外具有抗甲型流感病毒活性。

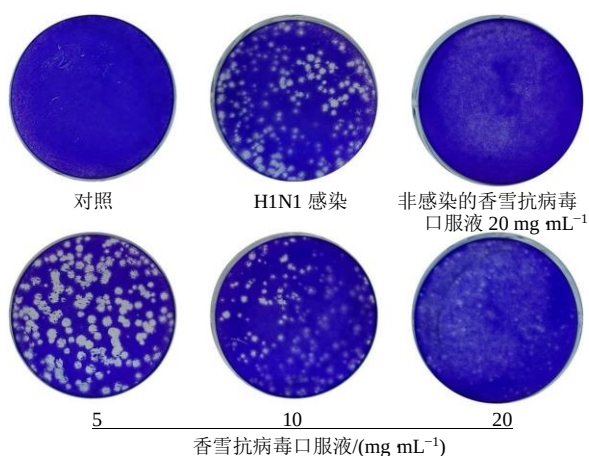


图 2 香雪抗病毒口服液对感染 H1N1 的 MDCK 细胞空斑数量的影响

Fig. 2 Effect of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid on the number of plaque in MDCK cells infected with H1N1

3.2 香雪抗病毒口服液对 H1N1 病毒感染的 NP 蛋白表达的影响

H1N1 病毒感染 MDCK 细胞后 0、2、4、6 h 给予香雪抗病毒口服液 10 mg/mL 干预治疗,结果显示 0~2 h 给药干预处理,病毒合成的 NP 蛋白不但明显减少(图 3),而且可以观察到大部分 NP 蛋白被限制在细胞核内;4~6 h 后再给药干预,对病毒合成的 NP 蛋白无影响。该结果提示香雪抗病毒口服液可抑制 H1N1 病毒的 NP 蛋白释放,且其作用阶段可能在病毒复制早期。

3.3 香雪抗病毒口服液对 H1N1 感染诱导的炎症细胞因子和趋化因子 mRNA 表达的影响

如图 4 所示,与模型组比较,香雪抗病毒口服

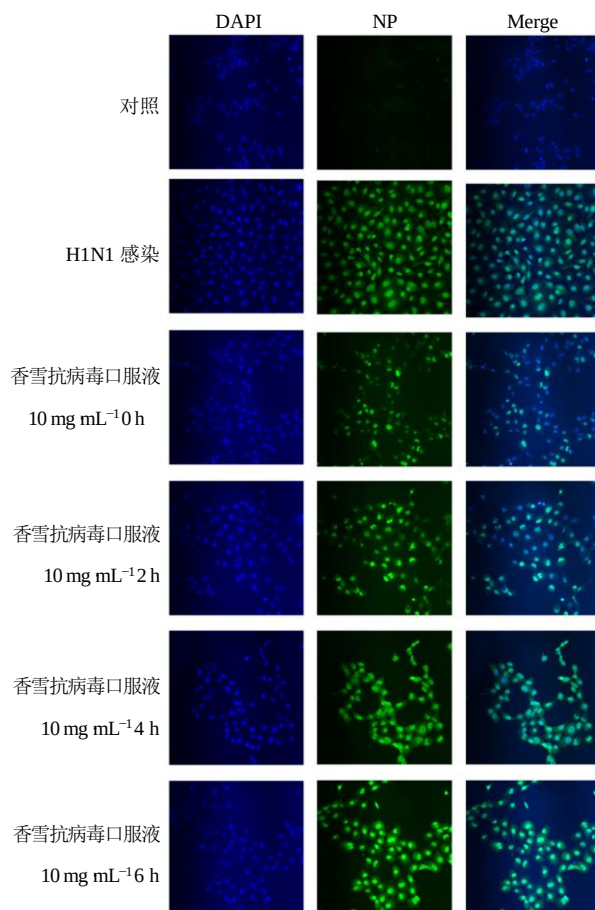


图 3 香雪抗病毒口服液对 H1N1 病毒感染 MDCK 细胞后 NP 蛋白表达和核输出的影响

Fig. 3 Effect of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid on NP protein expression and nuclear output of MDCK cells infected with H1N1 virus

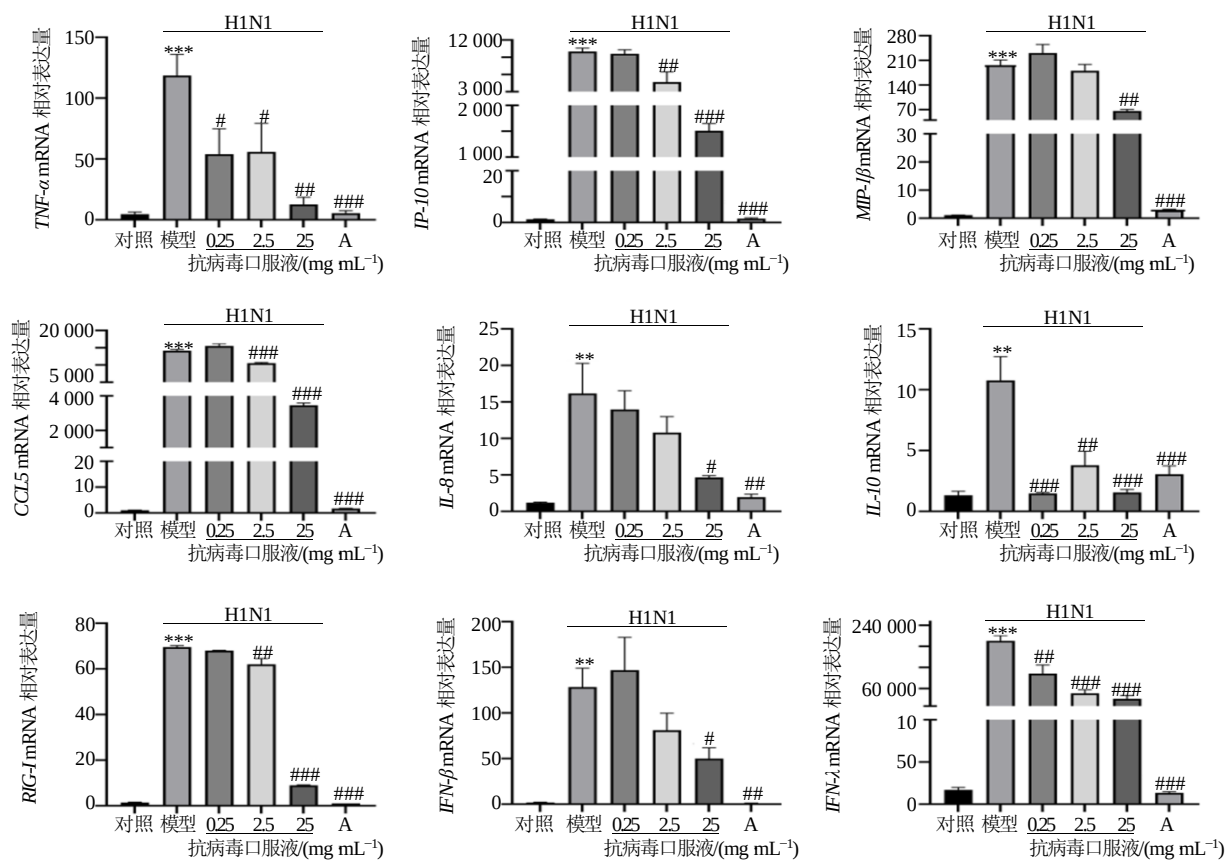
液能呈剂量相关性降低 H1N1 诱导的 A549 细胞炎症因子 *TNF-α*、*RIG-I*、*CCL5*、*MIP-1β*、*IP-10*、*IL-10*、*IFN-λ*、*IFN-β*、*IL-8* mRNA 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。非感染的香雪抗病毒口服液 25 mg/mL 组未引起显著的炎症反应。

3.4 香雪抗病毒口服液对 H1N1 感染诱导的信号通路分子表达的影响

如图 5 所示,与对照组相比,模型组的 TLR3、*RIG-I*、MDA-5 和磷酸化的 NF-κB p65、IκBα、STAT1、STAT2、STAT3 明显上调。而在香雪抗病毒口服液的干预下,能抑制 TLR3、*RIG-I* 和 MDA-5 受体的表达,下调 NF-κB p65、IκBα、STAT1、STAT2、STAT3 的磷酸化水平,且在 20 mg/mL 浓度下尤为明显。

4 讨论

香雪抗病毒口服液是以白虎汤和清瘟败毒饮



A-非感染抗病毒口服液 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$
 A-non-infective Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图 4 香雪抗病毒口服液对 H1N1 病毒诱导的 A549 细胞炎症因子 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid on the relative expression of mRNA of inflammatory factors in A549 cells induced by H1N1 virus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

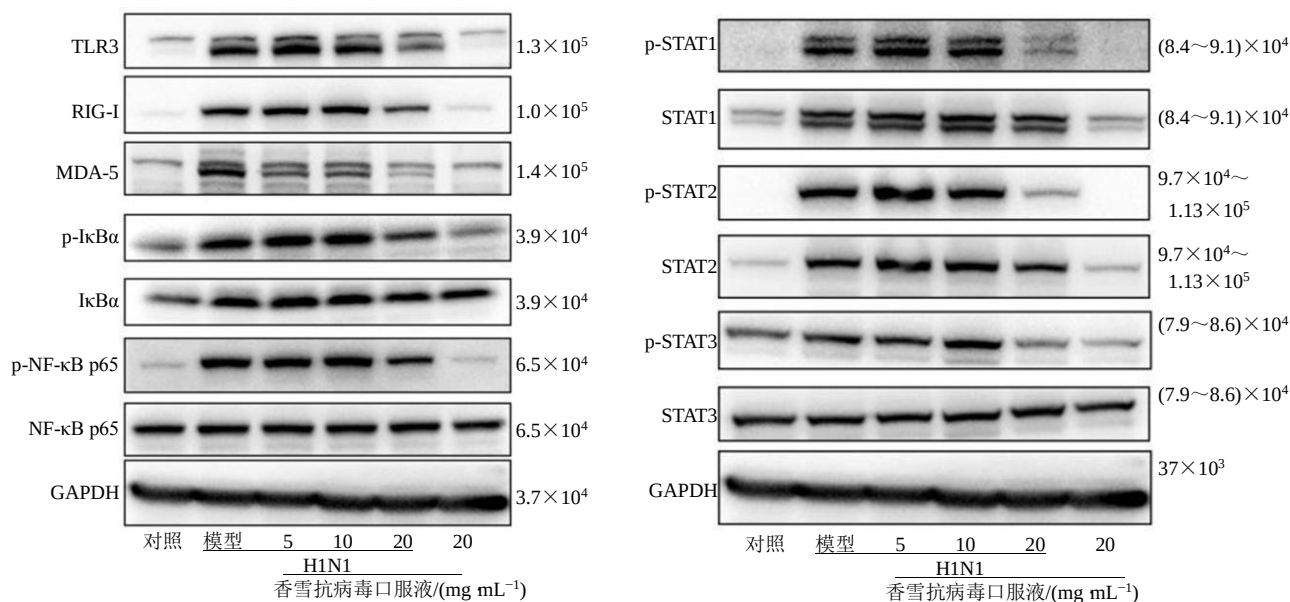


图 5 香雪抗病毒口服液对 H1N1 病毒感染 A549 细胞引起的信号通路蛋白的影响

Fig. 5 Effects of Xiangxue Kangbingdu Oral Liquid on signaling pathway proteins induced by H1N1 virus infection in A549 cells

为基础加减而制成。药理应用和临床实验研究发现其有较好的抗病毒疗效,但其抗病毒、抗炎的作用机制尚较少。此外,中药制剂由于现代工艺提取及遣方用药的配比不同,导致药效不同,而香雪抗病毒口服液是基于原有的中药成分,进行了新的配比研发得来。因此,本研究主要探讨了香雪抗病毒口服液的体外抗病毒和抗炎活性及作用机制。

本研究以 CPE 法、MTT 检测和空斑减少实验观察了香雪抗病毒口服液对甲型流感病毒的抗病毒作用。结果表明,香雪抗病毒口服液对 H1N1 和 H3N2 病毒的抑制作用显著,IC₅₀ 分别为 8.665、5.260 mg/mL,且能显著减少 H1N1 病毒斑块数目。同时免疫荧光实验发现,香雪抗病毒口服液可减少甲型流感病毒的 NP 蛋白合成,而且主要在流感病毒复制的早期,说明香雪抗病毒口服液可能作用于病毒入侵的吸附、穿入或内体释放阶段。另一种可能性与宿主的免疫调节有关。

流感病毒感染可诱导 IL-8、IL-10、TNF- α 、IP-10、CCL5、MIP-1 β 等细胞因子及趋化因子产生^[18],并激活 IFN 依赖的抗病毒宿主应答,但也可能引起炎症级联反应。研究表明,“细胞因子风暴”是诱发重症流感及死亡的原因之一^[19]。体外模型发现,经香雪抗病毒口服液 20 mg/mL 处理后, TNF- α 、CCL5、MIP-1 β 、IP-10、IL-10、IL-8、IFN- β 、IFN- λ mRNA 表达均显著降低。

当流感病毒通过呼吸道入侵机体后,靶向感染呼吸道上皮细胞,宿主天然免疫反应被迅速启动,通过模式识别受体 (PRRs),识别病原相关分子模式 (PAMPs),启动抗病毒级联反应。首先 PRRs (包括 RIG-I、MDA5、TLRs) 特异性识别在甲型流感病毒复制过程中形成的核酸和中间产物: RIG-I 和 MDA5 的 CARD 结构域进一步与线粒体膜中的 MAVS 蛋白发生作用; TLRs 依赖或不依赖 Myd88 适配体以激活 β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TRIF)^[20]。激活的 MAVS 和 TRIF 共同诱导 NF- κ B 的激活。在没有病原体刺激的情况下, NF- κ B 与 I κ B α 结合形成一个复合物。当 I κ B α 被激活形成磷酸化的 I κ B α 时,导致 NF- κ B/I κ B α 复合物降解并释放转录因子 p65,使 NF- κ B 信号通路激活,从而介导促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-8、IL-6 等) 以及 I 型 (IFN- α 、IFN- β)、II 型 (IFN- γ) 与 III 型 (IFN- λ) 干扰素的释放^[21]。机体的免疫反应有利于抵抗并清除病毒,减轻组织损伤,但过度的免疫反应也会介

导机体产生严重失衡的炎症因子风暴以及促使病毒的子代病毒复制。本研究的结果表明,20 mg/mL 香雪抗病毒口服液不仅抑制了 H1N1 感染引起的 A549 细胞中 RIG-I 和 MDA-5 表达的上调,而且还抑制了 TLR3 的表达。同时 NF- κ B p65 和 I κ B α 转录因子的磷酸化也明显受到抑制。

此外, IFNs 可以被适配器受体识别,并进一步激活 JAK-STAT 转录因子。然后,磷酸化的 STAT1 和 STAT2 形成异源二聚体,进入细胞核,诱导干扰素刺激基因 (ISGs) 的表达,调节抗病毒蛋白的合成,如 Mx 家族蛋白、干扰素诱导蛋白 15 抗体 (ISG-15)、干扰素诱导跨膜蛋白 (IFITM5) 等^[22-23]。20 mg/mL 香雪抗病毒口服液可显著抑制 p-STAT1 和 p-STAT2 转录因子的激活,从而抑制干扰素产生和级联放大效应。

综上,香雪抗病毒口服液对甲型流感病毒的作用机制可能是通过抑制模式识别受体 (RIG-I、MDA-5、TLR3) 的表达,从而抑制 NF- κ B 及 JAK-STAT 信号通路激活,下调促炎因子和趋化因子的产生,减少炎症反应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hause B M, Ducatez M, Collin E A, *et al.* Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(2): e1003176.
- [2] Hause B M, Collin E A, Liu R, *et al.* Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: Proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family [J]. *mBio*, 2014, 5(2): e00031-14.
- [3] Thompson W W, Shay D K, Weintraub E, *et al.* Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States [J]. *JAMA*, 2003, 289(2): 179-186.
- [4] Paules C, Subbarao K. Influenza [J]. *Lancet*, 2017, 390(10095): 697-708.
- [5] Principi N, Senatore L, Esposito S. Protection of young children from influenza through universal vaccination [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11(10): 2350-2358.
- [6] Boivin S, Cusack S, Ruigrok R W, *et al.* Influenza A virus polymerase: Structural insights into replication and host adaptation mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(37): 28411-28417.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
- [8] 张可新. 香雪抗病毒口服液的药理研究 [J]. 黑龙江科技信息, 2012(17): 8.

- [9] 李洪皎, 李凌香, 牟梓君, 等. 抗病毒口服液治疗普通感冒临床应用专家共识 [J]. 中医杂志, 2021, 62(11): 1008-1012.
- [10] 毛鑫, 姚荣妹, 高英杰, 等. 抗病毒口服液治疗甲型 H1N1 流感病毒感染药效及机制探讨 [J]. 中国药物警戒, 2018, 15(9): 518-522.
- [11] 肖利威. 应用抗病毒口服液治疗甲型 H1N1 流感病毒感染的临床研究 [J]. 中国医药指南, 2020, 18(21): 171-172.
- [12] 董巧丽, 柏金秀, 杨小巍, 等. 抗病毒口服液治疗手足口病普通病例的疗效观察 [J]. 儿科药学杂志, 2012, 18(6): 27-29.
- [13] 许明利, 胡思源, 林侃侃, 等. 抗病毒口服液治疗手足口病的研究进展 [J]. 中国药物经济学, 2020, 15(1): 125-128.
- [14] 区建坤. 抗病毒口服液治疗手足口病普通病例的疗效观察 [J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24(14): 3181-3182.
- [15] 陈欢. 线粒体 Mfn2/MAVS 抗病毒信号通路在抗病毒口服液降低拘束应激小鼠流感病毒“易感性”中的作用研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2016.
- [16] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. *Am J Epidemiol*, 1938, 27(3): 493.
- [17] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [18] Julkunen I, Sarenrva T, Pirhonen J, *et al*. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12(2-3): 171-180.
- [19] Iwasaki A, Pillai P S. Innate immunity to influenza virus infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(5): 315-328.
- [20] Ghoneim H E, Thomas P G, McCullers J A. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections [J]. *J Immunol*, 2013, 191(3): 1250-1259.
- [21] Chen X, Liu S, Goraya M U, *et al*. Host immune response to influenza A virus infection [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 320.
- [22] Park J H, Kim Y G, McDonald C, *et al*. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs [J]. *J Immunol*, 2007, 178(4): 2380-2386.
- [23] Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas P C, *et al*. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation [J]. *EMBO J*, 2008, 27(2): 373-383.

[责任编辑 高源]