

隐丹参酮体外抗病毒作用及机制研究

成翠芹¹, 马文福¹, 李琪琪², 孔令东², 谢芳¹, 贾鑫², 王遥^{1*}

1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100027

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100027

摘要: **目的** 探索隐丹参酮在细胞水平的抗病毒作用, 从药物调控宿主抗病毒免疫角度, 阐释隐丹参酮抑制病毒复制的分子机制。**方法** 通过流式细胞术、实时荧光定量PCR (qRT-PCR)、免疫印迹实验 (Western blotting) 等方法检测隐丹参酮对水疱性口炎病毒 (VSV)、甲型流感病毒 (H1N1)、脑心肌炎病毒 (EMCV)、I型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 复制的影响。基于基因集富集分析 (GSEA), 结合 qRT-PCR、流式细胞术, 分析隐丹参酮抗病毒的作用机制。在干扰素受体 IFNAR1 敲除 A549 细胞 (*Ifnar1*^{-/-}A549) 中, 检测 I 型干扰素 (IFN-I) 通路对隐丹参酮抗病毒功能的影响。**结果** 隐丹参酮显著抑制 VSV、H1N1、EMCV 和 HSV-1 病毒的复制, 在病毒进入前期和进入后阶段发挥抗病毒作用, 对病毒吸附过程无影响; 通过 GSEA 分析结合 qRT-PCR 验证, 证明隐丹参酮促进 IFN-I 信号通路的激活; 在 *Ifnar1*^{-/-}A549 细胞中, 隐丹参酮的抗病毒功能受到抑制。**结论** 隐丹参酮通过促进 IFN-I 信号通路激活抑制多种病毒复制。

关键词: 隐丹参酮; 抗病毒; 先天免疫; 干扰素; 干扰素刺激基因; 水疱性口炎病毒; 甲型流感病毒; 脑心肌炎病毒; I型单纯疱疹病毒

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 09-1706-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.002

In vitro antiviral function and mechanism of cryptotanshinone

CHENG Cuiqin¹, MA Wenfu¹, LI Qiqi², KONG Lingdong², XIE Fang¹, JIA Xin², WANG Yao¹

1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100027, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100027, China

Abstract: **Objective** To investigate effect of cryptotanshinone on viral replication at the cellular level, and to explain molecular mechanism from perspective of immune regulation. **Methods** Antiviral effect of cryptotanshinone on the replication of vesicular stomatitis virus (VSV), influenza A virus (H1N1), encephalomyocarditis virus (EMCV) and herpes simplex virus type I (HSV-1) were studied by flow cytometry, qRT-PCR and Western blotting. Based on Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), combined with qRT-PCR and flow cytometry, the antiviral mechanism of cryptotanshinone was analyzed. The effect of type I interferon (IFN-I) pathway on the antiviral function of cryptotanshinone was detected in IFNAR1 knockout A549 cells (*Ifnar1*^{-/-}A549). **Results** Cryptotanshinone significantly inhibited replication of vesicular stomatitis virus (VSV), influenza A virus subtype H1N1 (H1N1) and encephalomyocarditis virus (EMCV), exerted its antiviral effect before and after viral entry, but had no effect on viral attachment step. GSEA analysis combined with qRT-PCR proved that cryptotanshinone promoted the activation of IFN-I signaling pathway. The antiviral function of cryptotanshinone was inhibited in *Ifnar1*^{-/-}A549 cells. **Conclusion** Cryptotanshinone inhibits replication of various viruses by activating type I interferon pathway.

Key words: cryptotanshinone; antiviral function; innate immunity; interferon; interferon stimulating gene; vesicular stomatitis virus (VSV); influenza A virus subtype H1N1; encephalomyocarditis virus; herpes simplex virus type I

抗病毒天然免疫反应是宿主抵御病毒入侵的第一道防线^[1]。病毒感染宿主细胞后, 细胞内的模式识别受体 (PRRs) 通过识别病毒的病原相关分子模式 (PAMPs), 启动宿主抗病毒天然免疫应答以清

除病毒, 抵御病毒感染^[2]。抗病毒天然免疫反应主要依赖 4 类 PRRs 对病毒 DNA 或 RNA 等 PAMPs 进行识别, 包括识别 RNA 或 DNA 病毒的 Toll 样受体 (TLRs)、识别 RNA 病毒的视黄酸 (维甲酸) 诱导

收稿日期: 2022-05-10

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

第一作者: 成翠芹 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒及免疫药理。E-mail: chengcuiqin@bucm.edu.cn

*通信作者: 王遥, 教授, 研究方向为中药抗病毒及免疫药理。E-mail: yaowang@bucm.edu.cn

基因蛋白I(RIG-I)样受体(RLRs)、识别RNA病毒的Nod样受体(NLRs)以及识别DNA病毒的受体如cGAS(cyclic GMP-AMP synthase)等^[3]。当PRRs与相应病毒的PAMPs结合后,会激活细胞内一系列信号级联反应,进而激活核转录因子 κ B(NF- κ B)、干扰素调节因子3(IRF3)和干扰素调节因子7(IRF7)等转录因子,启动下游I型干扰素(IFN-I)及炎症因子的表达^[3]。其中,IFN-I是发挥抗病毒效应的主要细胞因子,也是应用最为广泛的一类抗病毒药物。

IFN-I抗病毒效应的发挥主要依赖于激活蛋白激酶(JAK)-信号转导子和转录激活子(STAT)信号通路。IFN-I与细胞表面的IFN受体IFNAR1和IFNAR2结合后,激活蛋白激酶JAK1和酪氨酸激酶TYK2,受体IFNAR1和IFNAR2被这2种激酶磷酸化后募集STAT,从而激活STAT蛋白发生磷酸化,磷酸化后的STAT形成同源或异源二聚体后入核,诱导干扰素刺激基因(ISGs)的表达^[1]。ISGs基因编码的蛋白具有多种抗病毒功能,包括抑制病毒的入侵、病毒核酸的复制、病毒蛋白的翻译和病毒粒子的释放等过程^[4]。因此,正向调控IFN-I信号通路,不仅能增加IFN-I的表达,而且可以提高下游ISGs的表达,发挥对IFN-I通路的级联放大效应。

丹参具有活血化瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈等功效,在抗炎^[5]、抗肿瘤^[6]、抗血栓^[7]等方面有广泛的研究。隐丹参酮是从丹参中分离得到的1种主要的脂溶性化合物^[8],呈橙色针状结晶,在药理活性方面取得很多研究进展,包括抗炎^[9-10]、抗肿瘤^[11]、心脏保护、神经保护、血管保护及抗代谢紊乱等。另外,有研究证明隐丹参酮可以通过靶向STAT3减少猪肺泡巨噬细胞中IL-10及CD163的表达,抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒^[12]。然而,隐丹参酮对于其他病毒的抗病毒效应及分子机制仍不明晰。本研究主要以IFN-I通路为切入点,探讨隐丹参酮细胞水平的抗病毒效应,为隐丹参酮的抗病毒研究和应用提供科学依据。

1 材料

1.1 实验仪器

CytoFLEX流式细胞仪购于美国Beckman公司;CFX96荧光定量PCR仪购于美国BIO-RAD公司;T100型PCR仪购于美国BIO-RAD公司;NANODROP ONEc型分光光度计购于美国Thermo公司;Sorvall™ Legend™ Micro 21R微量离心机购于美国Thermo公司;SpectraMax i3x多功能酶标仪购于美谷分子仪器(上海)有限公司;Mill-Q超纯水仪

购于美国Millipore公司;ZHCH-C1115B超净工作台购于上海智城分析仪器制造有限公司;DK-8D型电热恒温水槽购于上海一恒科技有限公司;SK-L180-Pro数控线性摇床购于大龙兴创实验仪器(北京)股份公司;EPS-300数显式稳压稳流电泳仪购于天能公司;SCI-VS型可调式混匀仪购于美国SCILOGEX公司;PowerPac型基础电泳仪购于美国Bio-rad公司;1300 Series A2型生物安全柜;Heracell 150i型CO₂培养箱购于美国Thermo公司;CKX53型倒置显微镜购于日本Olympus公司。

1.2 试剂

隐丹参酮(货号:PS0266-0025,每瓶10 mg,质量分数 $\geq 98.0\%$)购于成都普思生物科技股份有限公司;二甲基亚砜(DMSO,货号:D4540)购于Sigma公司;聚肌苷酸胞苷酸[poly(I:C) LMW,货号:tlrl-picw]购于Invivogen公司;聚乙烯亚胺(PEI,货号:BMS1003-A)购于Invitrogen公司;PBS粉末(货号:B640010)购于生工生物工程(上海)股份有限公司;Trizol Reagent(货号:15596018)购于Invitrogen公司;Evo M-MLV RT Kit(货号:AG11711)、SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit(货号:AG11701)购于湖南艾科瑞生物工程有限公司;DMEM高糖培养基(货号:C11995500CP)、青霉素-链霉素($10\,000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,货号:15140-122)、胎牛血清(FBS,货号:2358184P)购于Gibco公司;0.25%胰蛋白酶/EDTA细胞消化液(货号:T1300)购于北京索莱宝科技有限公司;CCK-8细胞增殖-毒性检测试剂盒(货号:CK04)购于东仁化学科技(上海)有限公司;低熔点琼脂糖(货号:50101)购于Lonza公司;结晶紫水溶液(1%,货号:G1059)购于北京索莱宝科技有限公司;4%多聚甲醛通用型组织固定液(货号:BL539A)购于Biosharp公司;Recombinant anti-VSV-G tag antibody(货号:ab183497)购于Abcam公司;超敏ELC发光液(货号:WBKLS0500)购于美国Millipore公司;羊抗兔IgG-HRP(货号:M21002)购于艾比玛特医药科技(上海)有限公司。

1.3 细胞和病毒

人非小细胞肺癌细胞A549细胞系、非洲绿猴肾细胞Vero细胞系来源于美国模式培养物集存库(ATCC),用含1%双抗、10%FBS的高糖DMEM培养基,于37℃、5%CO₂细胞培养箱培养。小鼠原代腹腔巨噬细胞(PM)细胞自制,小鼠[C57BL/6J小鼠,SPF级,体质量20 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,许可证号SCXK(京)2019-0010]ip

3% 硫乙醇酸盐培养基, 72 h 后收集腹腔渗出细胞, 37 °C 培养 2 h 后, 去除不贴壁细胞, 其余贴壁细胞均为小鼠 PM 细胞。干扰素受体 IFNAR1 敲除 A549 细胞 (*Ifnar1*^{-/-}A549) 由本实验室构建^[13]。带绿色荧光蛋白的水疱性口炎病毒 (VSV-GFP)、甲型流感病毒 (H1N1)、脑心肌炎病毒 (EMCV)、水疱性口炎病毒 (VSV)、I 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 由本实验室提供, 病毒扩增后置于 -80 °C 保存。

2 方法

2.1 药物的配制

隐丹参酮 10 mg 直接加入 1.687 1 mL DMSO, 充分振荡, 37 °C 超声 60 min, 滤过后即为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液, 分装后储存于 -80 °C 备用。根据具体使用浓度计算所需母液体积, 按照一定比例用 DMEM 完全培养基稀释至使用浓度, 充分涡旋振荡后, 加入细胞使用。

2.2 CCK-8 法检测隐丹参酮对 A549 细胞活力的影响

A549 细胞以每孔 1.5×10^4 密度接种于 96 孔板, 培养过夜使细胞完全贴壁; 用 DMEM 完全培养基稀释隐丹参酮母液 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 至相应浓度 (0、1、2、4、6、8、10、12、14、16、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 将稀释好的隐丹参酮溶液以每孔 100 μL 加入细胞中, 同时设置仅加入 DMEM 的空白组 (不含细胞) 和 0.1% DMSO 溶剂对照组 (含细胞), 每孔设置 3 个复孔, 于 5% CO_2 、37 °C 细胞培养箱中培养; 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 在细胞培养箱中孵育 30 min, 待上清变为橙黄色后, 使用酶标仪测定 450 nm 吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

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

2.3 流式细胞术检测 A549 细胞中隐丹参酮对 VSV-GFP 病毒复制的影响

A549 细胞以每孔 1.2×10^5 密度接种于 24 孔板, 培养过夜后, 用 PBS 清洗细胞 2 次, VSV-GFP 以感染复数 (MOI) 为 0.01 感染细胞, 同时加入 4.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的隐丹参酮共同孵育。本实验设置对照组 (培养基中加入同高浓度隐丹参酮所含相同比例 DMSO, DMSO 体积分数为 0.04%)、病毒模型组、隐丹参酮组。病毒与隐丹参酮共同孵育 12 h 后用预冷 PBS 清洗细胞, 取 100 μL 胰酶消化后, 200 μL 完全培养基终止反应, 收集细胞于 Beckman Coulter 流式细胞仪上机检测。

2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测隐丹参酮对 VSV、EMCV、H1N1、HSV-1 病毒 mRNA 的影响

于 24 孔板中每孔 1.2×10^5 密度接种 A549 细胞, 过夜培养至完全贴壁后, 以 MOI 为 0.01 的 VSV 病

毒、EMCV 病毒分别感染细胞 24、8 h, 同时加入 2、4、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的隐丹参酮共同孵育。本实验设置对照组 (培养基中加入同高浓度隐丹参酮所含相同比例 DMSO, DMSO 体积分数为 0.04%)、病毒模型组、隐丹参酮组。病毒与隐丹参酮共同孵育后, 收集细胞, 进行 RNA 提取、反转录、qRT-PCR 实验。H1N1 病毒感染 A549 细胞的病毒 MOI、实验分组、药物处理条件、检测指标同 EMCV 病毒, HSV-1 病毒感染 A549 的时间为 12 h, 其他处理同 EMCV。

RNA 提取: 每孔加入 500 μL Trizol Reagent 收集细胞, 每 500 μL Trizol Reagent 中加入 100 μL 氯仿, 充分混匀后离心取 200 μL 上层水相; 于水相中加入等体积的异丙醇沉淀 RNA, 后续用 75% 乙醇清洗 RNA 沉淀, 干燥后取适量 DEPC 水溶解沉淀; 用分光光度计测定 RNA 浓度, 并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

反转录: 根据 Evo M-MLV RT Kit 说明书进行反转录, 取一定质量 RNA 与 gDNA Clean Reagent、5 $\times$ gDNA Clean Buffer 混合后, 42 °C 反应 5 min 去除基因组 DNA; 向上述混合物中加入 Evo M-MLV RTase Enzyme Mix、RT Primer Mix、5 $\times$ RTase Reaction Buffer Mix I、RNase free water, 混匀后于 37 °C 反应 15 min, 使 RNA 反转录成 cDNA。

qRT-PCR: 根据 SYBR[®] Green Premix Pro Taq HS qPCR Kit 说明书, 配制 qRT-PCR 反应体系: 2 $\times$ SYBR[®] Green Pro Taq HS Premix、PCR 上游引物、PCR 下游引物、cDNA、RNase free water。使用 BioRad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System 进行检测, 引物序列如表 1 所示, 反应条件: 预变性 95 °C, 30 s, 1 个循环; 95 °C, 5 s; 60 °C, 30 s, 40 个循环。数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak) 方法进行计算。

2.5 免疫印迹实验 (Western blotting) 检测隐丹参酮对 VSV 病毒 G 蛋白的影响

于 12 孔板中以每孔 2.4×10^5 密度接种 A549 细胞, 过夜培养后以 MOI 为 0.005 的 VSV 病毒感染 A549 细胞 16 h, 同时加入 2、4、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的隐丹参酮共同孵育。本实验设置对照组、病毒模型组、隐丹参酮组。药物与病毒共同孵育 16 h 后加入 80 μL IP 裂解液充分裂解细胞, 离心后取适量上清, 加入 5 $\times$ Loading Buffer 100 °C 使蛋白变性, BCA 法测定蛋白浓度。制备聚丙烯酰胺凝胶, 上样后进行 SDS-PAGE 电泳、湿法转膜、封闭, 于 4 °C 过夜孵育一抗 Recombinant Anti-VSV-G tag antibody (1:3 000), 室温孵育羊抗兔二抗 (1:5 000), 最后进行显影, 观察

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Primer sequence for qRT-PCR

基因	物种	引物	引物序列(5'→3')
ATCB	人	上游	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
		下游	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
IFIT1	人	上游	AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA
		下游	CTGAAACCGACCATAGTGGAAT
IFIT2	人	上游	GACACGGTTAAAGTGTGGAGG
		下游	TCCAGACGGTAGCTTGCTATT
IFNB1	人	上游	GCTTGGATTCCTACAAAGAAGCA
		下游	ATAGATGGTCAATGCGGCGTC
β -actin	小鼠	上游	GTGACGTTGACATCCGTAAAGA
		下游	GCCGGACTCATCGTACTCC
Ifit1	小鼠	上游	ATCGCGTAGACAAAGCTCTTC
		下游	GTTTCGGGATGTCCTCAGTTG
Ifit2	小鼠	上游	CTGGGGAAACTATGCTTGGGT
		下游	ACTCTCTCGTTTTGTTCTTGG
Ifnb1	小鼠	上游	AGCTCCAAGAAAGGACGAACA
		下游	GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
H1N1-HA		上游	CCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA
		下游	GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT
VSV-G		上游	CAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACA
		下游	TTTCCTTGCAATTGTTCTACAGATGG
EMCV-1C		上游	CCGCGATGATGAAGGGCAAG
		下游	CGGGCATCCTGGTGGGTAAGT

目的条带变化情况。

2.6 流式细胞术检测隐丹参酮对VSV-GFP病毒复制周期的影响

A549细胞中,采用隐丹参酮不同加药方式,通过流式细胞术检测对VSV-GFP病毒的影响。

预给药隐丹参酮12 h:A549细胞以每孔 1.2×10^5 密度接种于24孔板,过夜培养后,加入2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 隐丹参酮预处理12 h,后弃掉上清液,加入VSV-GFP(MOI=0.01)感染12 h后,收样,通过流式细胞术检测隐丹参酮预处理条件下对绿色荧光蛋白(GFP)阳性细胞比率的影响。本实验设置对照组、病毒模型组、隐丹参酮预处理组。

病毒吸附2 h过程中给药隐丹参酮:A549细胞以每孔 1.2×10^5 密度接种于24孔板,过夜培养后,加入VSV-GFP(MOI=0.1),同时加入2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的隐丹参酮,于4℃(4℃的环境可以让病毒粒子只能吸附到细胞表面而不能进入)处理2 h,2 h后换液完全培养基,10 h后通过流式细胞术检测吸附2 h过程中给药隐丹参酮对GFP阳性细胞比率的影响。本

实验设置对照组、病毒模型组、隐丹参酮处理组。

病毒吸附2 h后给药隐丹参酮:A549细胞以每孔 1.2×10^5 密度接种于24孔板,过夜培养后,加入VSV-GFP(MOI=0.1)于4℃吸附2 h,后换液为2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的隐丹参酮,隐丹参酮处理10 h后,流式细胞术检测病毒吸附2 h后给药隐丹参酮对GFP阳性细胞比率的影响。本实验设置对照组、病毒模型组、隐丹参酮处理组。

病毒吸附2 h过程中及吸附2 h后均给药隐丹参酮:A549细胞以每孔 1.2×10^5 密度接种于24孔板,过夜培养后,加入VSV-GFP(MOI=0.1),同时加入2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的隐丹参酮,于4℃处理2 h,后换液为2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的隐丹参酮,10 h后通过流式细胞术检测病毒吸附2 h过程中及吸附2 h后均给药隐丹参酮对GFP阳性细胞比率的影响。本实验设置对照组、病毒模型组、隐丹参酮处理组。

2.7 RNA-Seq测序及生物信息学分析

于24孔板中每孔 1.2×10^5 密度接种A549细胞,过夜培养,加入8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 隐丹参酮处理24 h,收集

细胞,提取RNA,具体操作步骤同“2.4”项。对RNA进行质检,送至北京百迈客生物科技有限公司进行二代测序分析。本实验设置对照组、隐丹参酮组。

2.8 qRT-PCR检测隐丹参酮对A549细胞 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2* 基因表达的影响

于24孔板中每孔 1.2×10^5 密度接种A549细胞,过夜培养,加入 $4.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 隐丹参酮处理24 h,收集细胞,提取RNA、反转录、qRT-PCR检测隐丹参酮对 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2* 基因表达的影响,具体操作同“2.4”项。本实验设置对照组、隐丹参酮组。

2.9 qRT-PCR检测隐丹参酮对小鼠PM中 *Ifnb1*、*Ifit1*、*Ifit2* 基因表达的影响

取小鼠PM细胞,以每孔 5×10^5 密度接种于12孔板中,待细胞贴壁后,加入 $4.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 隐丹参酮处理24 h,收集细胞,提取RNA、反转录、qRT-PCR检测隐丹参酮对 *Ifnb1*、*Ifit1*、*Ifit2* 基因表达的影响,具体操作同“2.4”项。本实验设置对照组、隐丹参酮组。

2.10 qRT-PCR检测隐丹参酮对A549细胞poly(I:C)转染的影响

于24孔板中每孔 1.2×10^5 密度接种A549细胞,过夜培养,待细胞密度达到80%左右时,按照1:2的比例将刺激剂poly(I:C) ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与转染试剂polyethylenimine(PEI)于Opti-MEM减血清培养基中制成混合物,每孔加入50 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4~6 h后,换液为 $4.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 隐丹参酮,培养12 h,提取RNA,反转录,qRT-PCR检测隐丹参酮加药组相比单独poly(I:C)组,对 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2* 基因表达的影响,具体操作同“2.4”项。本实验设置对照组、poly(I:C)模型组、隐丹参酮组。

2.11 流式细胞术检测隐丹参酮对Vero细胞VSV-GFP病毒复制的影响

本实验设置对照组、病毒模型组、隐丹参酮组,具体操作同“2.3”项,隐丹参酮浓度为 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.12 流式细胞术检测隐丹参酮对 *Ifnar1*^{-/-}A549细胞VSV-GFP病毒复制的影响

本实验设置对照组、病毒模型组、隐丹参酮组,具体操作同“2.3”项,隐丹参酮浓度为 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.13 数据处理

使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析,使用单因素方差分析进行组间比较,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 隐丹参酮对A549细胞无毒浓度的确定

通过CCK-8法检测不同浓度的隐丹参酮处理

24 h后对A549细胞存活率的影响,计算得到半数抑制浓度(IC_{50})为 $16.06 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图1)。后续选取无明显细胞毒性的低、中、高浓度(2、4、8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)进行实验。

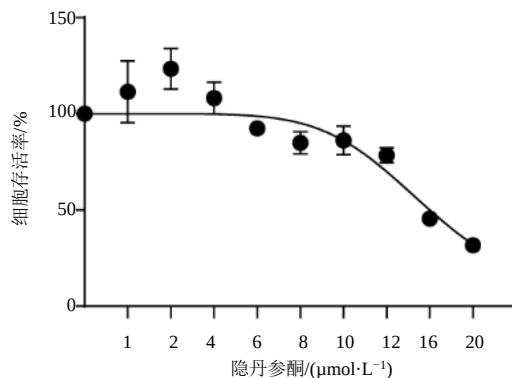


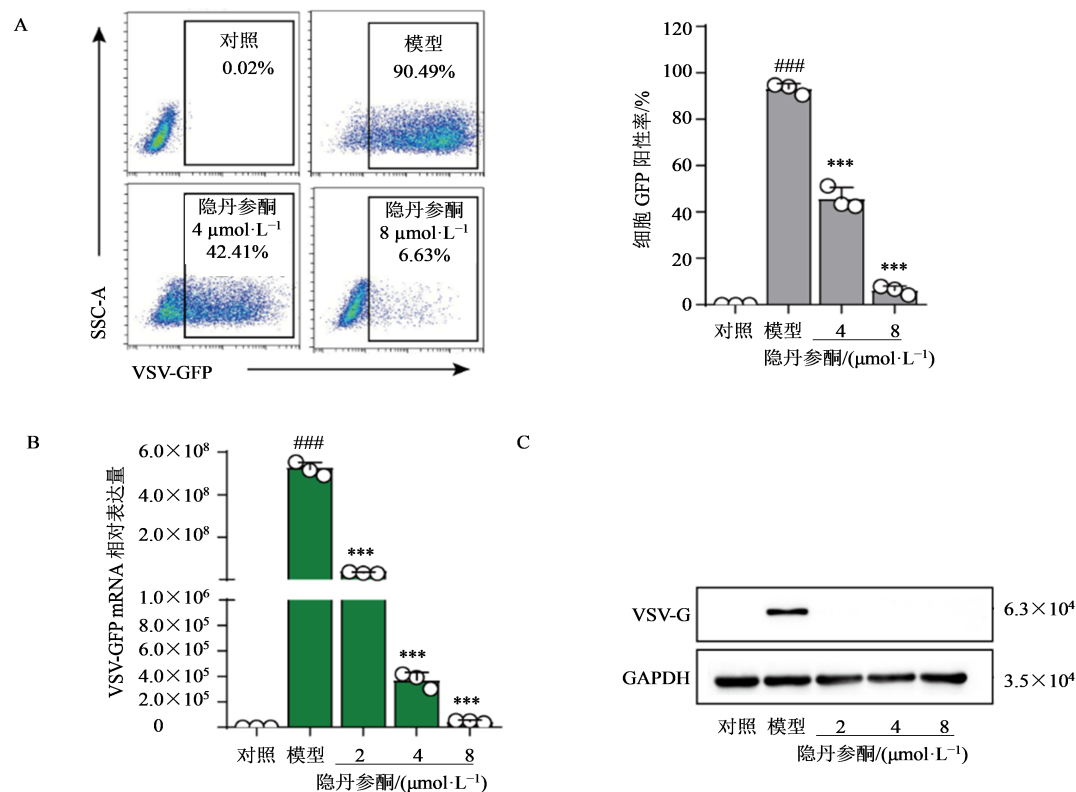
图1 隐丹参酮对A549细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effect of cryptotanshinone on survival rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.2 隐丹参酮抑制病毒复制

3.2.1 隐丹参酮对VSV病毒复制的影响 利用带GFP标签的VSV病毒感染A549细胞,通过流式细胞术及qRT-PCR技术,检测VSV病毒复制情况。流式结果表明,与对照组比较,病毒模型组GFP阳性细胞比率较高 ($P < 0.001$);与病毒模型组比较,隐丹参酮组GFP阳性细胞比率明显降低 ($P < 0.001$), $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 隐丹参酮组抑制病毒复制效果显著 ($P < 0.001$),结果见图2-A。qRT-PCR结果表明,与对照组比较,病毒模型组VSV病毒RNA丰度较高 ($P < 0.001$);与病毒模型组比较,隐丹参酮组显著抑制VSV病毒RNA丰度 ($P < 0.001$),结果见图2-B。通过Western blotting实验检测隐丹参酮在蛋白水平对VSV病毒的影响,结果表明,与对照组比较,病毒模型组VSV病毒G蛋白大量表达,与病毒模型组比较,隐丹参酮组显著抑制VSV病毒G蛋白表达,结果见图2-C。

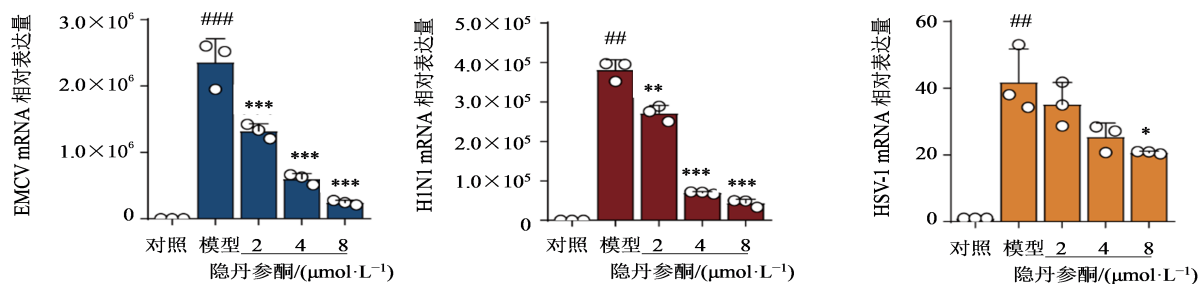
3.2.2 隐丹参酮对EMCV、H1N1、HSV-1病毒复制的影响 为了探究隐丹参酮对不同病毒的抑制作用,利用EMCV、H1N1、HSV-1感染A549细胞,同时加入隐丹参酮处理通过qRT-PCR技术检测病毒基因拷贝情况,结果表明,与对照组比较,病毒模型组病毒基因的拷贝数均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001);与病毒模型组比较,隐丹参酮组病毒基因的拷贝数均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),说明隐丹参酮抑制EMCV、H1N1、HSV-1病毒的复制,结果见图3。



A-流式细胞仪检测; B-qRT-PCR 检测; C-Western blotting 检测; 与对照组比较: $^{###}P < 0.001$; 与模型(病毒感染)组比较: $^{***}P < 0.001$
A-flow cytometry detection; B-qRT-PCR detection; C-Western blotting detection; $^{###}P < 0.001$ vs control group; $^{***}P < 0.001$ vs model (viral infection) group

图2 隐丹参酮对A549细胞中VSV病毒复制的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Inhibition of cryptotanshinone on VSV replication in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$; 与模型(病毒感染)组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$
 $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model (viral infection) group

图3 隐丹参酮对A549细胞中EMCV、H1N1、HSV-1病毒复制的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Inhibition of cryptotanshinone on EMCV, H1N1, and HSV-1 replication in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 隐丹参酮作用于VSV-GFP病毒复制周期的多个阶段

为了探究隐丹参酮对VSV-GFP病毒复制周期不同阶段的影响,设置了不同的加药方式(图4-A),分别为吸附前预给药隐丹参酮、吸附2 h过程中给药隐丹参酮、吸附2 h后给药隐丹参酮、吸附2 h过程中及吸附2 h后给药隐丹参酮,通过流式细胞术检测不同药物处理方式下隐丹参酮对VSV-GFP病

毒复制的影响。流式细胞术结果表明,吸附前预给药隐丹参酮处理方式下,与对照组比较,病毒模型组具有较高的GFP阳性细胞比率($P < 0.001$);与病毒模型组比较,隐丹参酮预给药组可以显著降低GFP阳性细胞比率($P < 0.001$),表明隐丹参酮预给药可以抑制病毒复制,隐丹参酮在病毒进入前发挥作用(图4-B)。吸附过程中给药隐丹参酮处理方式下,与对照组比较,病毒模型组具有较高的GFP阳

性细胞比率($P<0.001$);与病毒模型组比较,吸附过程中给药隐丹参酮组也具有较高的GFP阳性细胞比率,没有显著性变化,表明隐丹参酮对病毒吸附过程没有影响(图4-C)。吸附2 h后给药隐丹参酮、吸附2 h过程中及吸附2 h后给药隐丹参酮处理下,与对照组相比,病毒模型组具有较高的GFP阳性细胞比率($P<0.001$);与病毒模型组比较,病毒吸附2 h后给药隐丹参酮组和病毒吸附2 h过程中及吸附2 h后给药隐丹参酮组GFP阳性细胞比率均显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)见图4-D、E。以上结果共同表明,隐丹参酮预处理及吸附后给药可以显著抑制病毒复制,其对病毒的吸附过程无影响。

3.4 隐丹参酮调控先天免疫,激活IFN-I信号通路

3.4.1 隐丹参酮对A549细胞基因的影响 利用RNA-Seq测序技术并结合生物信息学分析,进一步探究隐丹参酮处理引起的A549细胞中的基因变化。结果显示,与正常A549细胞(对照组)比较,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 隐丹参酮处理24 h后A549细胞测序分析共富集到2 416个差异表达基因,其中上调基因有1 076个,下调基因有1 340个(图5-A)。对差异表达基因进行基因集富集分析(GSEA)分析发现,差异基因富集到与抗病毒天然免疫应答相关的Toll like receptor signaling related to MyD88、Jak-stat signaling pathway等信号通路(图5-B、C)。

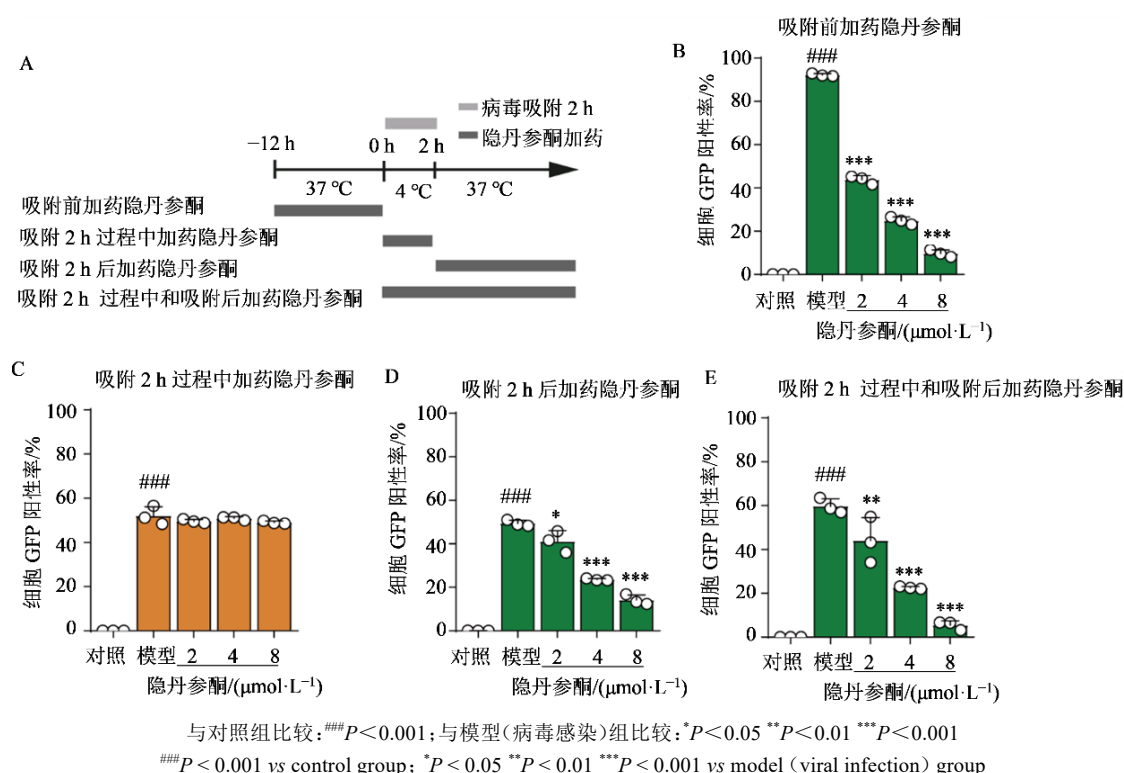


图4 隐丹参酮在病毒复制周期不同阶段给药对VSV-GFP病毒复制的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of cryptotanshinone administration at different stages of virus replication cycle on VSV-GFP virus replication ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

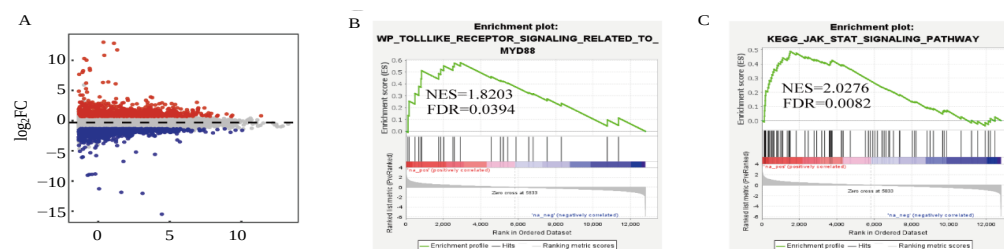


图5 RNA-Seq测序分析隐丹参酮引起A549细胞中的基因变化(A-差异表达基因;B、C-信号通路)

Fig. 5 Gene changes in A549 cells induced by cryptotanshinone detected by RNA-Seq analysis (A-differentially expressed genes; B, C-signaling pathways)

3.4.2 隐丹参酮对 A549 和 PM 细胞中 IFN-I 通路相关基因表达的影响 由于 IFN-I 及其下游靶基因的表达直接反映宿主细胞的抗病毒免疫状态。因此,利用 qRT-PCR 技术检测隐丹参酮处理的 A549 和 PM 细胞中 IFN-I 通路的相关基因表达变化。qRT-PCR 结果显示,与对照组比较,隐丹参酮组可以诱导 A549 和 PM 细胞中 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2* 基因表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),结果见图 6-A、B。poly(I:C)是 1 种合成的双链 RNA(dsRNA)类似物,可模拟

RNA 病毒感染。在 A549 细胞中转染 poly(I:C) 5 h 后,加入隐丹参酮处理 12 h,qRT-PCR 结果显示,与对照组比较,模型组高表达 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2*($P<0.001$);与模型组比较,隐丹参酮组进一步增强 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2* mRNA 表达($P<0.01$ 、 0.001),尤其以促进 *IFNB1* 表达更明显,表明隐丹参酮以浓度相关方式促进 poly(I:C)对 IFN-I 通路的激活效应(图 7)。以上结果表明,隐丹参酮处理可直接激活 IFN-I 信号通路。因此,推测这可能是其发挥抗病毒效应的机制之一。

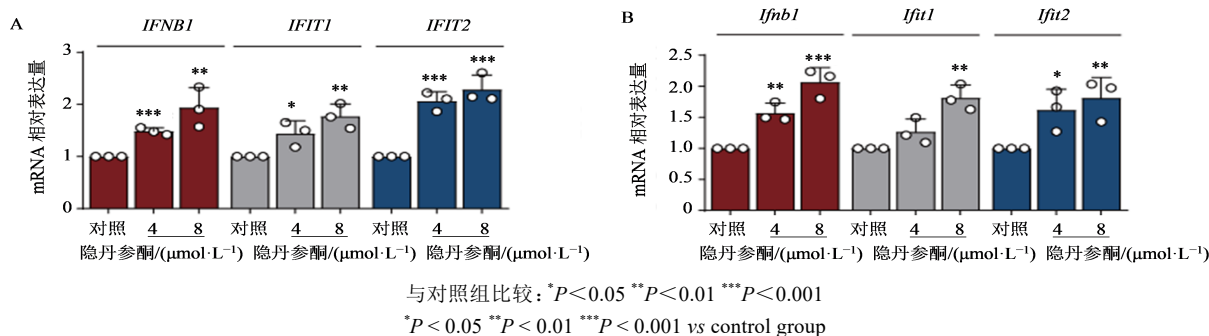


图 6 隐丹参酮对 A549 细胞(A)、PM 细胞(B) IFN-I 通路中相关基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effects of cryptotanshinone on expression of related genes in IFN-I pathway of A549 cells (A) and PM cells (B) ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

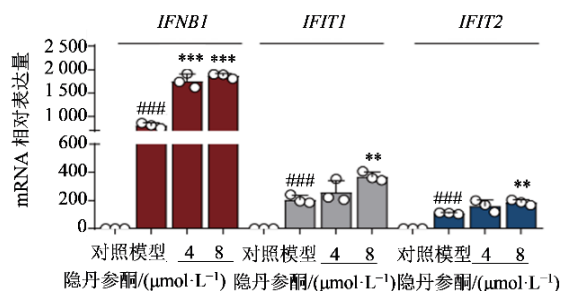


图 7 隐丹参酮对 poly(I:C)转染 A549 细胞 IFN-I 通路中 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2* 基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Fig. 7 Effects of cryptotanshinone on expression of *IFNB1*, *IFIT1* and *IFIT2* genes in IFN-I pathway of poly(I:C) transfected A549 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.5 隐丹参酮对 Vero 和 *Ifnar1*^{-/-} A549 细胞中 VSV-GFP 病毒复制的影响

Vero 细胞是一种天然的干扰素信号通路缺陷的细胞^[14]。鉴于隐丹参酮单独加药后可以激活 A549 细胞与 PM 细胞内 IFN-I 信号通路,引起 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2* 基因上调。利用 VSV-GFP 感染 Vero 细胞,结合流式细胞术分析,发现与模型组相比,隐丹参酮组 GFP 阳性细胞比率稍有降低($P<$

0.05),结果见图 8-A。进一步利用本实验室构建的干扰素受体 IFNAR1 敲除 A549 细胞(*Ifnar1*^{-/-} A549),探究隐丹参酮发挥抗病毒作用与 IFN-I 信号通路的关系。流式结果显示,野生型细胞(A549 细胞)中,隐丹参酮加药后的 GFP 阳性细胞比率降至 30%;*Ifnar1*^{-/-} A549 细胞中隐丹参酮加药后的 GFP 阳性细胞比率下降至 60%,隐丹参酮抗病毒功能被显著削弱,表明隐丹参酮的抗病毒功能在一定程度上依赖 IFN-I 信号通路(图 8-B)。

4 讨论

丹参具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等广泛的药理作用,临床上主要用于心血管疾病的治疗^[15]。最新的研究表明,丹参通过对宿主免疫系统的整体调控,影响免疫细胞的发育、激活^[16-17],并发挥炎症性疾病、抗肿瘤的药理药效。此外,丹参提取物具有抗病毒作用^[18-19],其提取物可减少肠病毒 71 型(EV71)RNA 合成,抑制由 EV71 所引起的细胞病变效应,从而改善由 EV71 所引起的细胞凋亡^[19];丹参在体内均发挥有抗新型冠状病毒(SARS-Cov-2)的作用,在 293T 细胞中半数有效浓度(EC_{50})为 $0.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[18]。然而,隐丹参酮作为丹参中主要的脂溶性成分,其抗病毒功能与机制仍不甚明晰^[20],开展隐丹参酮的抗病毒研究对阐明丹参的抗病毒药理药效具有重要意义。

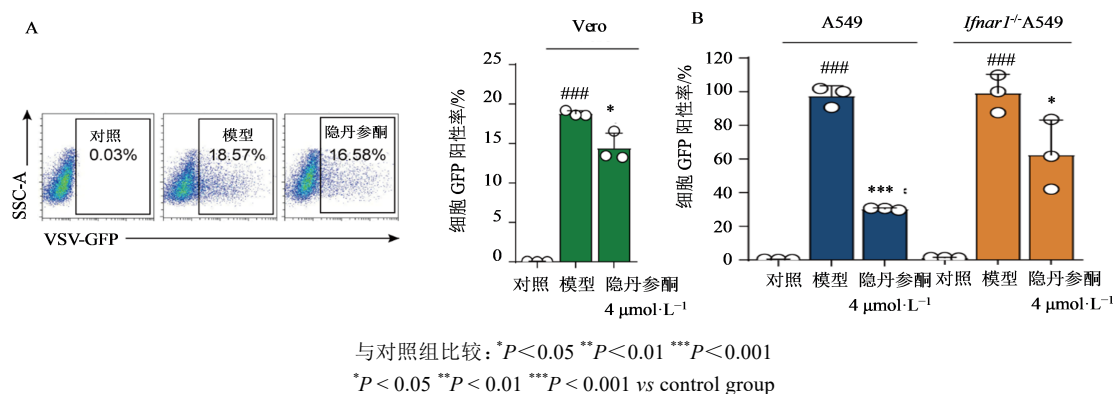


图8 隐丹参酮对Vero细胞(A)、*Ifnar1*^{-/-}A549细胞(B)中VSV-GFP病毒复制的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effects of cryptotanshinone on VSV-GFP virus replication in Vero cells(A) and *Ifnar1*^{-/-}A549 cells(B)($\bar{x} \pm s, n=3$)

本研究利用流式细胞术、qRT-PCR等技术证明了隐丹参酮可在细胞水平抑制VSV、VSV-GFP、EMCV、H1N1、HSV-1病毒复制。通过在VSV-GFP病毒吸附前后的不同阶段加药处理,发现隐丹参酮预处理和在病毒进入后处理,其抗病毒效应最为明显。通过生物信息学分析结合qRT-PCR验证,发现在A549细胞和小鼠PM细胞中,隐丹参酮单独处理即可诱导*IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2*基因表达。提示隐丹参酮可以直接调控细胞内的IFN-I信号通路。此外,发现在Vero细胞中隐丹参酮的抗病毒功能受到抑制,在*Ifnar1*^{-/-}A549细胞中隐丹参酮的抗病毒功能也被显著削弱。这些结果共同表明,隐丹参酮发挥抗病毒作用部分依赖干扰素信号通路。其激活IFN-I通路抗病毒的具体分子机制将是以后进一步研究的重点。

本研究表明隐丹参酮在细胞水平可以抑制VSV、VSV-GFP、EMCV、H1N1、HSV-1病毒复制,其抗病毒作用一定程度上依赖基于IFN-I通路的抗病毒天然免疫应答。揭示了隐丹参酮发挥抗病毒效应的部分分子机制,为丹参及隐丹参酮的抗病毒研究提供可靠的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wu J X, Chen Z J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids [J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 461-480.
- [2] Aoshi T, Koyama S, Kobiyama K, et al. Innate and adaptive immune responses to viral infection and vaccination [J]. Curr Opin Virol, 2011, 1(4): 226-232.
- [3] Liu G Q, Gack M U. Distinct and orchestrated functions of RNA sensors in innate immunity [J]. Immunity, 2020, 53 (1): 26-42.
- [4] Schneider W M, Chevillotte M D, Rice C M. Interferon-

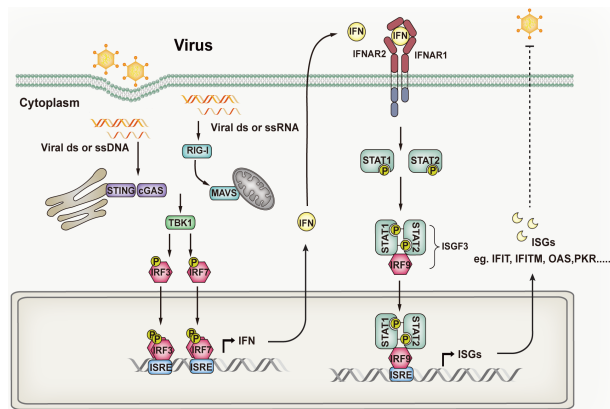
stimulated genes: A complex web of host defenses [J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 513-545.

- [5] Ye T T, Xiong D, Chen L B, et al. Effect of Danshen on TLR2-triggered inflammation in macrophages [J]. Phytomedicine, 2020, 70: 153228.
- [6] Chen X P, Guo J J, Bao J L, et al. The anticancer properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen): A systematic review [J]. Med Res Rev, 2014, 34(4): 768-794.
- [7] Fei Y X, Wang S Q, Yang L J, et al. *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) extract attenuates permanent cerebral ischemia through inhibiting platelet activation in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 207: 57-66.
- [8] 单晓晓, 洪帮振, 刘洁, 等. 丹参化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5496-5511.
- [9] Shan X X, Hong B Z, Liu J, et al. Review of chemical composition, pharmacological effects, and clinical application of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and prediction of its Q-markers [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(21): 5496-5511.
- [10] Li X X, Zheng X T, Liu Z J, et al. Cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) inhibited inflammatory responses via TLR4/MyD88 signaling pathway [J]. Chin Med, 2020, 15: 20.
- [11] Zhou Y, Wang X, Ying W H, et al. Cryptotanshinone attenuates inflammatory response of microglial cells via the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Front Neurosci, 2019, 13: 852.
- [12] Han Z, Liu S, Lin H S, et al. Inhibition of murine hepatoma tumor growth by cryptotanshinone involves TLR7-dependent activation of macrophages and induction of adaptive antitumor immune defenses [J]. Cancer Immunol Immunother, 2019, 68(7): 1073-1085.
- [13] Huang C, Zhu J, Wang L, et al. Cryptotanshinone protects porcine alveolar macrophages from infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus

- [J]. Antiviral Res, 2020, 183: 104937.
- [13] Wang Y, Yuan S, Jia X, et al. Mitochondria-localised ZNFX1 functions as a dsRNA sensor to initiate antiviral responses through MAVS [J]. Nat Cell Biol, 2019, 21 (11): 1346-1356.
- [14] Emeny J M, Morgan M J. Regulation of the interferon system: Evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production [J]. J Gen Virol, 1979, 43(1): 247-252.
- [15] Wang L Y, Yu J H, Fordjour P A, et al. Danshen injection prevents heart failure by attenuating post-infarct remodeling [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 205: 22-32.
- [16] Liu L, Jia J, Zeng G, et al. Studies on immunoregulatory and anti-tumor activities of a polysaccharide from *Salvia miltiorrhiza* bunge [J]. Carbohydr Polym, 2013, 92(1): 479-483.
- [17] Liu S, Han Z, Trivett A L, et al. Cryptotanshinone has curative dual anti-proliferative and immunotherapeutic effects on mouse Lewis lung carcinoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2019, 68(7): 1059-1071.
- [18] Wang W, Li S S, Xu X F, et al. Danshensu alleviates pseudo-typed SARS-CoV-2 induced mouse acute lung inflammation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(4): 771-780.
- [19] Wu B W, Pan T L, Leu Y L, et al. Antiviral effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against *Enterovirus* 71 [J]. Am J Chin Med, 2007, 35(1): 153-168.
- [20] Li H Y, Gao C D, Liu C, et al. A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone, an important active constituent in Danshen [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 137: 111332.

[责任编辑 刘东博]

•封面图片介绍•



抗病毒天然免疫信号通路

抗病毒天然免疫反应是宿主抵御病毒入侵的第一道防线。病毒释放基因组进入细胞质,宿主细胞通过模式识别受体(RIG-I/cGAS等)识别并结合病原体相关分子模式(如病毒基因组),将病毒入侵信号传递给接头分子(MAVS/STING),进而激活转录因子IRF3和IRF7转位入核,启动I型干扰素的转录和表达。干扰素分泌到细胞外,可被自身和临近细胞表面受体(IFNAR1/IFNAR2)识别,激活Jak-STAT信号通路,诱导大量干扰素刺激基因(interferon stimulated genes, ISGs)表达。ISGs可在病毒生命周期的不同阶段(包括入侵、复制、装配和释放等)发挥广谱的抗病毒效应。

北京中医药大学 贾鑫、王遥、张美琦、成翠芹