

小檗胺的体外抗病毒作用及基于I型干扰素通路的机制研究

王浩嘉¹, 李 森¹, 连 瑞¹, 董秋童², 何昱廷², 贾 鑫^{2*}, 王 遥^{1*}

1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102400

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102400

摘要: 目的 观察小檗胺的体外抗病毒作用, 并基于I型干扰素 (IFN-I) 通路的抗病毒天然免疫反应探讨其作用机制。方法 CCK-8法检测0.001、0.010、0.100、1.000、10.000、100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的小檗胺对A549细胞活力的影响; 表达绿色荧光蛋白的水疱性口炎病毒 (VSV-GFP) 以0.05的感染复数 (MOI) 感染A549细胞制备模型, 流式细胞术检测共同孵育12 h的小檗胺2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对GFP阳性细胞比例的影响; VSV感染A549细胞, Western blotting检测小檗胺对VSV病毒G蛋白表达的影响; 小檗胺使用预处理12 h、病毒吸附过程中给药2 h、病毒吸附后给药10 h 3种不同方式给药, 通过流式细胞术检测其对VSV-GFP在A549细胞中复制的影响; 分别使用甲型流感病毒 (H1N1) (MOI=0.05), 脑心肌炎病毒 (EMCV) (MOI=3) 和单纯疱疹病毒1型 (HSV-1) (MOI=1) 感染A549细胞, 同时给药共同孵育12 h后, 实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 检测小檗胺对病毒RNA表达的影响; 小檗胺10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理A549细胞24 h, 进行转录组测序分析; 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗胺处理MEF细胞12 h后, qRT-PCR法检测 *Ifnb1*、*Ifit1*、*Ifit2*、*Ifi44* 基因的mRNA表达; 利用IFN刺激性DNA (ISD) 转染THP-1细胞, 预先激活IFN-I信号通路, 4~6 h加入小檗胺5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理12 h, qRT-PCR法检测 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2*、*IFI44* 基因的mRNA表达。结果 浓度为10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下时, 小檗胺对A549细胞均未显示出明显的细胞毒性; 与模型组相比, 小檗胺剂量相关性地减少了VSV-GFP阳性细胞的比例 ($P<0.05$ 、 0.001), 明显减少了病毒的VSV-G蛋白表达; 小檗胺对VSV的吸附过程没有影响, 而预处理或吸附后给药可以显著抑制病毒复制; 与模型组比较, 小檗胺剂量相关性地抑制了H1N1、EMCV和HSV-1的病毒基因表达 ($P<0.001$); 转录组测序和qRT-PCR结果表明, 小檗胺促进细胞基于IFN-I信号通路的抗病毒免疫激活; 在ISD刺激后, 小檗胺诱导更高水平的 *IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2*、*IFI44* mRNA表达 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 小檗胺可能通过促进基于IFN-I通路的抗病毒天然免疫反应抑制多种病毒复制。

关键词: 小檗胺; 水疱性口炎病毒 (VSV); 甲型流感病毒 (H1N1); 脑心肌炎病毒 (EMCV); 单纯疱疹病毒1型 (HSV-1); 抗病毒免疫; 干扰素; 干扰素刺激基因

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2023) 06-1185-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.06.004

Antiviral effect *in vitro* and mechanism study based on type I interferon pathway of berbamine

WANG Haojia¹, LI Sen¹, LIAN Rui¹, DONG Qiutong², HE Yuting², JIA Xin², WANG Yao¹

1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China

Abstract: Objective Observe the antiviral effect of berbamine *in vitro* and explore its mechanism of action based on the antiviral natural immune response of the type I interferon (IFN-I) pathway. **Methods** CCK-8 method for detecting effect of 0.001, 0.010, 0.100, 1.000, 10.000, 100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ berbamine on the viability of A549 cells. The vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein (VSV-GFP) infected A549 cells with 0.05 multiplicity of infection (MOI). Flow cytometry was used to detect the effect of berbamine 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ co-incubated for 12 h on the proportion of GFP positive cells. VSV infected A549 cells, and the effect of berbamine on the expression of VSV-G protein was detected by Western blotting. Berberine was administered in

收稿日期: 2023-04-06

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(82001663)

第一作者: 王浩嘉, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒药理。E-mail: wanghaojia77@163.com

*共同通信作者: 贾 鑫, 硕士生导师, 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

王 遥, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药抗病毒及免疫药理。E-mail: yaowang@bucm.edu.cn

three different ways: pre-treatment for 12 h, administration during virus adsorption for 2 h, and administration after virus adsorption for 10 h, and its effect on VSV-GFP replication in A549 cells was detected by flow cytometry. A549 cells were infected with influenza A virus (H1N1) (MOI = 0.05), myocarditis virus (EMCV) (MOI = 3), and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) (MOI = 1), respectively. After co-incubation for 12 h, the effect of berberine on virus RNA expression was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). A549 cells were treated with berbamine $10.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h, and transcriptome sequencing was performed. After treating MEF cells with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ berbamine for 12 h, qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of *Ifnb1*, *Ifit1*, *Ifit2*, and *Ifi44* genes. Transfection of THP-1 cells using IFN stimulated DNA (ISD) was performed, and the IFN-I signaling pathway was pre-activated. Berberine 5 and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were added after 4—6 h to treat for 12 h. mRNA expression of *IFNB1*, *IFIT1*, *IFIT2*, and *IFI44* genes was detected by qRT-PCR. **Results** At concentrations of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and below, berbamine did not exhibit significant cytotoxicity on A549 cells. Compared with the model group, berbamine dose dependently reduced the proportion of VSV-GFP positive cells ($P < 0.05, 0.001$), and significantly reduced the expression of virus VSV-G protein. Berberine had no effect on the adsorption process of VSV, while pre-treatment or administration after adsorption can significantly inhibit virus replication. Compared with model group, berberine dose-related inhibition of viral gene expression in H1N1, EMCV, and HSV-1 ($P < 0.001$). The results of transcriptome sequencing and qRT-PCR showed that berbamine promoted the antiviral immune activation of cells based on IFN-I signaling pathway. After ISD stimulation, berbamine induced higher levels of *IFNB1*, *IFIT1*, *IFIT2*, and *IFI44* mRNA expression ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusions** Berbamine may inhibit the replication of multiple virus by promoting antiviral innate immune responses based on the IFN-I signaling.

Key words: berbamine; vesicular stomatitis virus (VSV); influenza A virus (H1N1); encephalomyocarditis virus (EMCV); herpes simplex virus type 1 (HSV-1); antiviral immunity; interferon; interferon-stimulated genes

抗病毒天然免疫是宿主抵御病毒感染的第一道防线。当病毒侵入宿主细胞时,病毒核酸等病原相关分子模式(PAMPs)会被细胞内的模式识别受体(PRRs)识别,进而激活细胞内的一系列信号级联反应,诱导下游干扰素- β (IFN- β)等I型干扰素(IFN-I)以及促炎因子的表达,从而启动抗病毒天然免疫反应抵御病毒感染^[1]。IFN是一种分泌型蛋白,其介导的抗病毒作用是天然免疫反应的重要组成部分^[2]。IFN产生后与细胞表面的IFN受体结合,进而激活下游Janus激酶/信号转导与转录激活子(JAK-STAT)信号通路,并诱导大量的干扰素刺激基因(ISGs)表达,这些ISGs靶向病毒生命周期的多个环节发挥广泛的抗病毒效应^[3]。

小檗胺是一种从小檗科Berberidaceae等植物中提取的双苜基异喹啉生物碱^[4]。现代研究表明,小檗胺具有抗高血压、抗心律失常、抗高血糖、抗肿瘤和免疫调节等广泛药理作用,小檗胺的盐酸盐在临床中常用于治疗化疗等原因引起的白细胞减少症^[4-5]。利用不同的细胞模型,研究人员发现小檗胺具有抑制新型冠状病毒(SARS-CoV-2)^[6]和埃博拉病毒(EBOV)^[7]的药理活性。然而,小檗胺对于其他类型病毒的抑制作用仍不明确,其抑制病毒复制的分子机制有待进一步研究。本研究观察小檗胺在体外对水疱性口炎病毒(VSV)、甲型流感病毒(H1N1)、脑心肌炎病毒(EMCV)、单纯疱疹病毒1型(HSV-1)复制的抑制作用,并基于IFN-I通路的

抗病毒天然免疫反应探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

小檗胺(质量分数 $\geq 99.0\%$,货号T3S0807)购于上海陶术生物科技有限公司,溶于二甲基亚砜(DMSO)配制成 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的药液,储存于 $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用;DMSO(货号D4540)购于Sigma公司;IFN刺激性DNA(ISD,货号t1rl-isdn)、聚乙烯亚胺(PEI,货号BMS1003-A)、Trizol Reagent(货号15596018),均购于Invitrogen公司;Evo M-MLV RT Kit(货号AG11711)、SYBR[®]Green Premix Pro Taq HS q PCR 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;Recombinant antiVSV-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Ig G-HRP(货号M21002)购于艾比玛特医药科技(上海)有限公司。

1.2 细胞和病毒

人非小细胞肺癌A549细胞系、人源单核细胞白血病THP-1细胞系,来源于美国典型培养物保藏

中心(ATCC),小鼠原代胚胎成纤维细胞(MEF)从小鼠胚胎中分离,细胞使用含1%双抗、10% FBS的高糖DMEM培养基,于37℃、5% CO₂细胞培养箱培养。表达绿色荧光蛋白(GFP)的水疱性口炎病毒(VSV-GFP)、野生型水疱性口炎病毒(VSV)、甲型流感病毒(H1N1)、脑心肌炎病毒(EMCV)、单纯疱疹病毒1型(HSV-1)由本实验室提供,病毒扩增后置于-80℃保存。

1.3 实验仪器

Cyto FLEX 流式细胞仪(美国 Beckman 公司); CFX96 荧光定量 PCR 仪、T100 型 PCR 仪、Power Pac 型基础电泳仪(美国 Bio-rad 公司); Spectra Max i3x 多功能酶标仪(美谷分子仪器有限公司); SK-L180-Pro 数控线性摇床(大龙兴创实验仪器股份公司); 1300 Series A2 型生物安全柜、Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 细胞活力测定

A549 细胞以每孔 3×10^4 的密度接种于 96 孔板,培养过夜使细胞完全贴壁;配制 0、0.001、0.010、0.100、1.000、10.000、100.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的小檗胺加入细胞中,于 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中培养;24 h 后,向每孔细胞加入 10 μL CCK-8 试剂孵育 30 min,无细胞孔为空白孔,使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A)值,计算细胞相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 流式细胞术检测小檗胺对 VSV-GFP 病毒复制的影响

A549 细胞以每孔 1.2×10^5 的密度接种于 24 孔板,培养过夜至细胞贴壁后,分为对照组、模型组和小檗胺 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组,除对照组外,VSV-GFP 以 0.05 的感染复数(MOI)感染各组细胞^[8],同时加药共同孵育,对照组与模型组加入 DMSO。孵育 12 h 后用预冷 PBS 清洗细胞 2 次,取 100 μL 胰酶消化,收集细胞至流式管于 Beckman Coulter 流式细胞仪上机检测 GFP 阳性细胞比例。

2.3 Western blotting 检测小檗胺对 VSV 病毒 G 蛋白的影响

细胞接种、分组、造模(使用 VSV 感染)、给药方式同“2.2”项,共同孵育 16 h 后,收集细胞,加入 IP 裂解液充分裂解,离心后取上清,加入 Loading Buffer 100℃ 使蛋白变性,BCA 法测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳、湿法转膜、封闭,于 4℃ 孵育 Recombinant Anti-VSV-G tag antibody (1:3 000) 过

夜,然后室温孵育羊抗兔二抗(1:5 000)2 h,加入 ECL 化学发光试剂,于凝胶成像仪中曝光显影。

2.4 小檗胺不同给药方式对 VSV-GFP 病毒复制周期的影响

小檗胺使用预处理、病毒吸附过程中给药、病毒吸附后给药 3 种不同方式给药,通过流式细胞术检测其对 VSV-GFP 在 A549 细胞中复制的影响。

预处理:细胞接种、分组同“2.3”项,A549 细胞接种于 24 孔板培养过夜后,加药预处理 12 h,然后弃上清液,PBS 清洗细胞 2 次,加入 VSV-GFP (MOI=0.05) 感染。培养 12 h 后收集细胞,通过流式细胞术检测 GFP 阳性细胞比例。

病毒吸附过程中给药:细胞接种、分组同“2.3”项,A549 细胞接种于 24 孔板培养过夜后,加入 VSV-GFP (MOI=0.05) 感染,同时加药,于 4℃ 处理 2 h,然后弃上清液,PBS 清洗细胞 2 次,补充细胞培养基继续培养。10 h 后收集细胞,通过流式细胞术检测 GFP 阳性细胞比例。

病毒吸附后给药:细胞接种、分组同“2.3”项,A549 细胞接种于 24 孔板培养过夜后,加入 VSV-GFP (MOI=0.05) 于 4℃ 吸附 2 h,然后弃上清液,PBS 清洗细胞 2 次,加药继续培养。10 h 后收集细胞,通过流式细胞术检测 GFP 阳性细胞比例。

2.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测小檗胺对 H1N1、EMCV 和 HSV-1 病毒 RNA 表达的影响

细胞接种、分组同“2.3”项,分别使用 H1N1 (MOI=0.05),EMCV (MOI=3) 和 HSV-1 (MOI=1) 感染细胞^[8],同时加药共同孵育。共同孵育 12 h 后,收集细胞,加入 Trizol Reagent 提取 RNA,然后反转录为 cDNA 进行 qRT-PCR 实验,检测病毒基因的 RNA 表达水平。

2.6 RNA 测序及转录组分析

A549 细胞接种于 24 孔板,培养过夜后,加入 DMSO(对照组)或 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗胺处理 24 h,收集细胞,加入 Trizol Reagent 提取 RNA,然后反转录为 cDNA 进行测序。使用 Hieff NGS Ultima Dual-mode mRNA Library Prep Kit for Illumina (Yeasen Biotechnology Co., Ltd.) 产生测序文库。文库在 Illumina NovaSeq 平台上测序,产生 150 bp 的成对端读数。使用 Hisat2 工具软件与参考基因组进行映射,并获得每个样本中基因的原始表达值。使用 edgeR 进行差异表达分析,错误发现率(FDR)<0.05 且 $|\log_2(\text{FC})| > 1$ 的基因被认为是差异表达基因。基

基因组富集分析(GSEA)是在GSEA软件上运行的, 基因集来自MSigDB数据库。

2.7 qRT-PCR检测小檗胺对ISGs mRNA表达的影响

MEF细胞以每孔 1×10^5 的密度接种于24孔板,

培养过夜后,加入DMSO(对照组)或 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗胺处理12 h,收集细胞,加入Trizol Reagent提取RNA,然后反转录为cDNA进行qRT-PCR实验,检测*Ifnb1*、*Ifit1*、*Ifit2*、*Ifi44*基因的mRNA表达。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	序列(5'→3')	
<i>ACTB</i>	F-CATGTACGTTGCTATCCAGGC	R-CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>IFIT1</i>	F-AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA	R-CTGAAACCGACCATAGTGGAAT
<i>IFIT2</i>	F-GACACGGTTAAAGTGTGGAGG	R-TCCAGACGGTAGCTTGCTATT
<i>IFI44</i>	F-ATGGCAGTGACAACCTCGTTTG	R-TCCTGGTAACTCTCTTCTGCATA
<i>IFNB1</i>	F-GCTTGGATTCTACAAAGAAGCA	R-ATAGATGGTCAATGCGGCGTC
<i>Actb</i>	F-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	R-GCCGGACTCATCGTACTCC
<i>Ifnb1</i>	F-AGCTCCAAGAAAGGACGAACA	R-GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
<i>Ifit1</i>	F-ATCGCGTAGACAAAGCTCTTC	R-GTTTCGGGATGTCCTCAGTTG
<i>Ifit2</i>	F-CTGGGGAAACTATGCTTGGGT	R-ACTCTCTCGTTTTGGTTCTTGG
<i>Ifi44</i>	F-ATGCTCCAACCTGACTGCTCG	R-ACAGCAATGCCTCTGTCTTT
<i>H1N1-HA</i>	F-CCCGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA	R-GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT
<i>EMCV-1C</i>	F-CCGCGATGATGAAGGGCAAG	R-CGGGCATCCTGGTGGGTAAGT
<i>HSV-1-ICP27</i>	F-TTTCTCCAGTGCTACCTGAAGG	R-TCAACTCGCAGACACGACTCG

2.8 qRT-PCR检测ISD刺激后小檗胺对ISGs mRNA表达的影响

THP-1细胞以每孔 5×10^5 的密度接种于12孔板,培养过夜后,分为对照组、模型组和小檗胺 5 、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,除对照组外,按照1:2的比例将ISD($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)与转染试剂polyethylenimine(PEI)于Opti-MEM减血清培养基中混合,每孔加入 $50 \mu\text{L}$,于 37°C 培养4~6 h,对照组转染Mock。离心,弃上清液,对照组与模型组加入DMSO,小檗胺组给药,继续培养12 h。收集细胞,加入Trizol Reagent提取RNA,然后反转录为cDNA进行qRT-PCR实验,检测*IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2*、*IFI44*基因的mRNA表达。引物序列见表1。

2.9 数据处理

数据用GraphPad Prism进行可视化处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组样本间通过双尾非配对t检验进行比较,多组样本间通过单因素方差分析进行比较。

3 结果

3.1 小檗胺对A549细胞相对存活率的影响

如图1所示,小檗胺对A549细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为 $56.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,当使用浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小檗胺对A549细胞均未显示出明显的细胞毒性,细胞相对存活率达90%以上,因此在后续的实验,小檗胺的使用浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下。

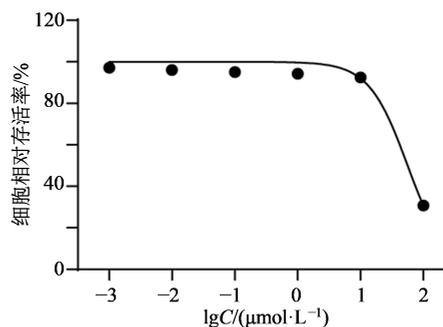


图1 小檗胺对A549细胞相对存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 1 Effect of berbamine on relative survival rate of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 小檗胺对VSV复制的影响

如图2-A所示,与对照组比较,VSV-GFP感染引起了A549细胞GFP阳性细胞比例的增加($P < 0.001$);与模型组相比,小檗胺剂量相关性地减少了GFP阳性细胞的比例($P < 0.05, 0.001$),尤其在浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制病毒复制的效果显著,使感染细胞比例降低至检测限附近。接下来检测了小檗胺对于野生型VSV的抑制作用,如图2-B所示,与模型组相比,小檗胺明显减少了病毒的VSV-G蛋白表达。这些数据表明小檗胺能够在细胞水平显著抑制VSV的复制。

3.3 小檗胺不同给药方式对VSV-GFP复制周期的影响

如图3-A所示,为了探究小檗胺不同给药方式

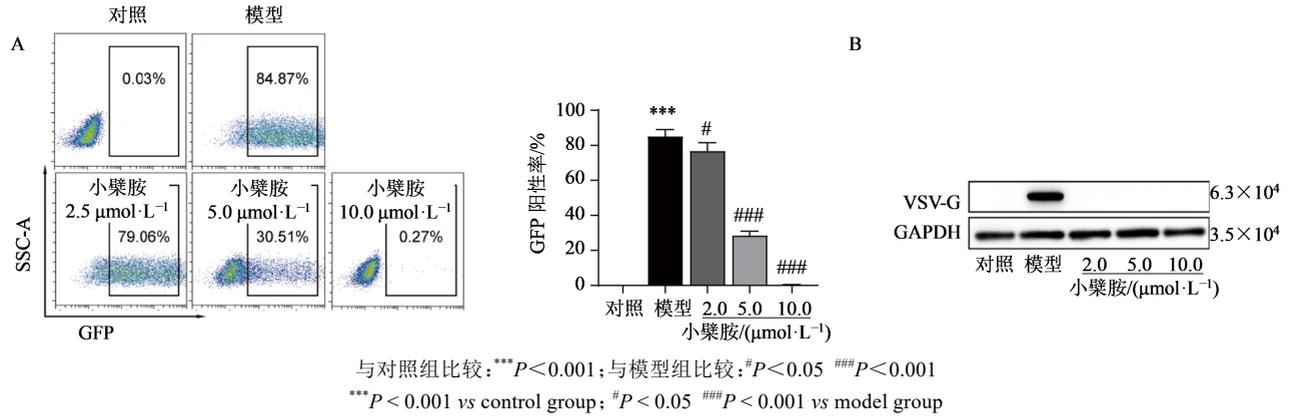


图2 小檗胺对VSV-GFP感染细胞比例(A)和VSV感染细胞中的VSV-G蛋白表达(B)的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Fig. 2 Effect of berbamine on proportion of VSV-GFP-infected cells (A) and VSV-G protein expression in VSV-infected cells (B) ($\bar{x}\pm s, n=3$)

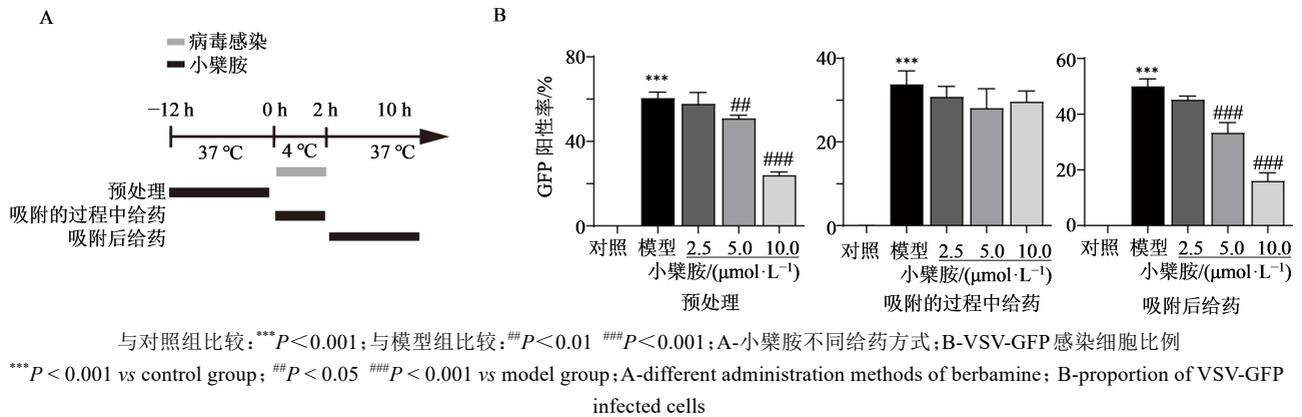


图3 小檗胺不同加药时间对VSV-GFP感染细胞比例的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Fig. 3 Time-of-addition assay of BBM on proportion of VSV-GFP-infected cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

对VSV-GFP病毒复制周期的影响,分别对细胞进行了预处理、病毒吸附过程中给药、病毒吸附后给药。如图3-B所示,小檗胺预处理过的A549细胞,相对于模型组,在感染后表现出更低的GFP阳性细胞比例,5.0、10.0 μmol·L⁻¹组差异显著($P<0.01, 0.001$),且抑制趋势呈剂量相关性,表明小檗胺预处理即可抑制病毒复制,具有预防作用。然而,在病毒吸附的过程中给药时,任何浓度的小檗胺与模型组相比都未显示出GFP阳性细胞比例的显著差异,表明小檗胺不抑制病毒的吸附过程。而在病毒吸附2 h后给药,与模型组比较,小檗胺能够剂量相关性地降低GFP阳性细胞比例,5.0、10.0 μmol·L⁻¹组差异显著($P<0.001$),表明小檗胺在病毒进入后产生了抗病毒作用。结果表明,小檗胺对VSV的吸附过程没有影响,而预处理或吸附后给药可以显著抑制病毒复制。

3.4 小檗胺对H1N1、EMCV、HSV-1复制的影响

如图4所示,与模型组比较,小檗胺剂量相关性

地抑制了H1N1、EMCV和HSV-1的病毒基因表达,在2.5 μmol·L⁻¹即可发挥显著抑制作用($P<0.001$),各浓度小檗胺组的RNA水平均降低了50%以上。结果表明,小檗胺能够在细胞水平显著抑制H1N1、EMCV和HSV-1的复制。

3.5 转录组分析显示小檗胺诱导抗病毒天然免疫信号通路的激活

为了探究小檗胺调节的细胞内信号通路,对小檗胺处理的A549细胞进行了RNA测序以及转录组分析。如图5-A所示,与对照组相比,小檗胺处理诱导了549个差异表达基因,其中包含367个上调基因,182个下调基因。值得注意的是,几种与抗病毒IFN-I通路相关的基因被显著上调,如*OAS2*、*IFIT3*、*IFIH1*、*CXCL8*等(图5-A)。另外,如图5-B所示,基于基因表达值的GSEA分析发现,小檗胺处理组显著富集到与抗病毒天然免疫反应相关的Toll样受体信号、细胞因子与受体相互作用等信号通路。结果表明,小檗胺可能在细胞中诱导抗病毒天然免疫信

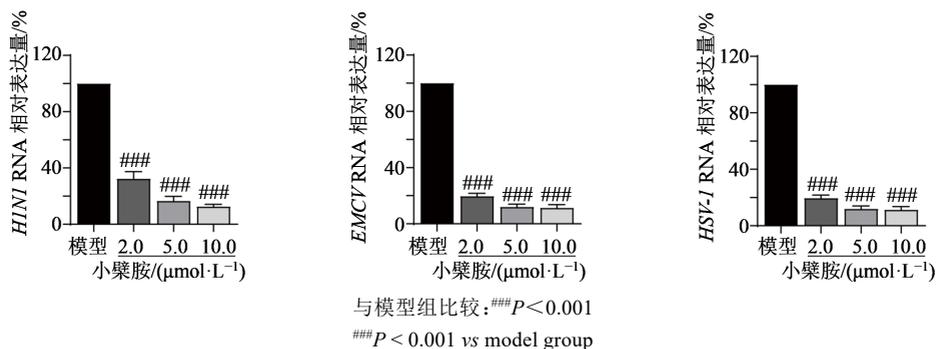


图4 小檗胺对H1N1、EMCV和HSV-1感染细胞中的病毒RNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of berberamine on viral RNA expression in H1N1, EMCV and HSV-1 infected cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

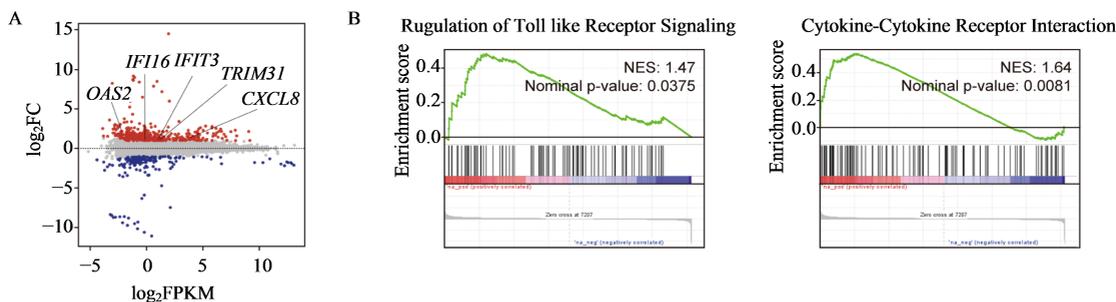


图5 小檗胺转录组的差异表达基因(A)和GSEA(B)

Fig. 5 Differentially expressed genes of berberamine transcriptome (A) and GSEA (B)

号通路的激活。

3.6 小檗胺活化IFN-I信号通路

IFN-I信号通路是抗病毒天然免疫应答的关键环节。为了验证小檗胺是否对IFN-I信号通路具有调节作用,检测了小檗胺处理MEF细胞中*Ifnb1*以及ISGs的表达情况。如图6所示,与对照组比较,小檗胺处理显著诱导*Ifnb1*表达($P < 0.001$),几种ISGs *Ifit1*、*Ifit2*、*Ifi44*的mRNA水平也显著上调($P < 0.05$ 、 0.001)。结果表明,小檗胺处理能激活IFN-I信号通路,诱导*Ifnb1*和IFN-I刺激基因的表达。

3.7 小檗胺促进ISD诱导的IFN-I信号通路激活

利用双链DNA类似物ISD转染THP-1细胞,预

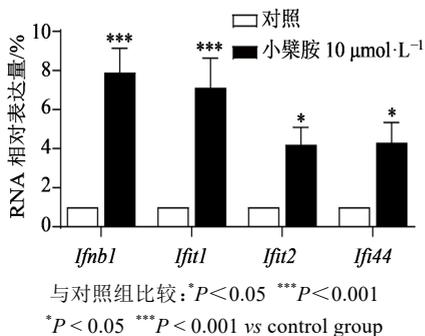


图6 小檗胺激活IFN-I通路相关基因的表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

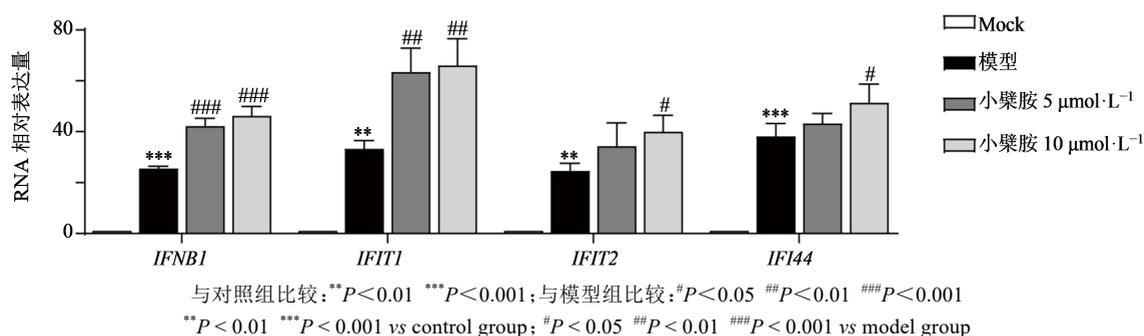
Fig. 6 Effect of berberamine on expression of genes related to IFN-I pathway ($\bar{x}\pm s, n=3$)

先激活IFN-I信号通路,随后加入小檗胺处理细胞。qRT-PCR结果显示(图7),与对照组比较,ISD刺激显著激活了*IFNB1*和*IFIT1*、*IFIT2*、*IFI44*的表达($P < 0.01$ 、 0.001);在ISD刺激后使用小檗胺处理,诱导了更高水平的*IFNB1*、*IFIT1*、*IFIT2*、*IFI44* mRNA表达($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结果表明,小檗胺在IFN-I信号被诱导后进一步促进了该通路的激活。

4 讨论

小檗属植物作为药用植物使用具有悠久的历史,如少齿小檗、细叶小檗等是传统中药三颗针的基原植物,它们大多具有清热燥湿、泻火解毒的功效,可用于治疗湿热泻痢、黄疸湿疹、咽痛目赤^[4]。现代植物化学研究表明,小檗属植物中富含生物碱、黄酮类、固醇类、糖类以及三萜类等化合物,其中生物碱是被广泛研究的主要活性成分^[9]。小檗胺是小檗属植物的根茎中最常见的苜基异喹啉生物碱之一,在部分毛茛科植物如黄连中也有分布^[4,10],具有广泛的天然来源。在临床中,盐酸小檗胺常用于治疗化疗、放疗以及慢性苯中毒各种原因引起的白细胞减少症。

研究表明小檗胺可能具有良好的抗病毒活性。如印度小檗的甲醇提取物对于丙型肝炎病毒(HCV)显示出体外抑制活性^[11];小檗胺能够破坏

图7 ISD刺激后小檗胺对IFN-I通路相关基因表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)Fig. 7 Effect of berbamine on expression of genes related to IFN-I pathway after ISD stimulation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

病毒感染依赖的宿主因子的内溶酶体运输,从而抑制病毒的进入过程^[6,12];盐酸小檗胺能直接与EBOV糖蛋白结合,破坏糖蛋白与病毒受体Niemann-Pick C1相互作用阻断EBOV与细胞膜的融合^[7]。然而,小檗胺对于H1N1、HSV1等其他人类病毒的抗病毒作用与机制尚不明晰。

本研究利用流式细胞术、qRT-PCR等技术证明了小檗胺能够在细胞水平抑制VSV、H1N1、EMCV、HSV-1的病毒复制,进一步明确了小檗胺的抗病毒谱。通过不同给药方式的实验,发现小檗胺对VSV的吸附过程没有影响,而小檗胺预处理细胞能够预防病毒的感染,表明小檗胺可能在细胞中诱导抗病毒免疫状态的改变。通过转录组测序以及转录组分析发现,小檗胺能够在细胞中诱导抗病毒天然免疫反应通路的激活。进一步的qRT-PCR分析结果显示,小檗胺处理诱导IFNB1、IFIT1、IFIT2等ISGs的表达,激活了IFN-I信号通路。此外,小檗胺能够促进ISD诱导的IFN-I信号通路激活。这些结果共同表明,小檗胺可能通过调节细胞内的IFN-I信号通路发挥抗病毒作用。

IFN-I信号通路介导的抗病毒天然免疫是宿主抵抗病原体入侵的重要组成,该通路激活后诱导数百种ISGs的表达,这些基因产物靶向病毒复制的不同环节,共同建立了宿主的“抗病毒状态”^[2]。虽然疫苗和针对病毒复制的特定步骤的抗病毒药物是目前用于对抗病毒感染的最有效治疗策略,但面对不断出现的病毒突变株或耐药株,这些特定策略的开发往往具有局限性或延迟性,而IFN介导的抗病毒天然免疫反应具有广谱的抗病毒作用,在面对急性病毒感染时显示出独特优势^[13]。基于IFN的疗法在临床上广泛用于各种病毒性疾病的治疗^[13-15],如使用重组IFN- α 治疗HCV感染^[16]等。为了克服IFN须注射给药以及半衰期短等缺点,激活IFN-I反应

的小分子逐渐成为抗病毒治疗策略开发的重要方向^[17-21]。

目前小檗胺在临床上已经被用于治疗白细胞减少症,其药物的安全性得到了广泛的临床评价,具有进一步开发为抗病毒药物的天然优势。本研究结果表明小檗胺能够在细胞水平抑制VSV、H1N1、EMCV、HSV-1等病毒的复制,并促进基于IFN-I通路的抗病毒天然免疫反应,为小檗胺的抗病毒机制研究和临床应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mogensen T H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses [J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(2): 240-273.
- [2] Stetson D B, Medzhitov R. Type I interferons in host defense [J]. Immunity, 2006, 25(3): 373-381.
- [3] Platanias L C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling [J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(5): 375-386.
- [4] 陈元, 李思琪, 陈紫葳, 等. 小檗胺在药用植物中的分布与药理活性 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(10): 2018-2025.
Chen Y, Li S Q, Chen Z W, et al. Distribution and pharmacological activity of berbamine in medicinal plants [J]. Mod Chin Med, 2022, 24(10): 2018-2025.
- [5] Farooqi A A, Wen R, Attar R, et al. Regulation of cell-signaling pathways by berbamine in different cancers [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(5): 2758.
- [6] Huang L H, Yuen T T, Ye Z D, et al. Berbamine inhibits SARS-CoV-2 infection by compromising TRPMLs-mediated endolysosomal trafficking of ACE2 [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 168.
- [7] Yi D R, Li Q J, Wang H, et al. Repurposing of berbamine hydrochloride to inhibit Ebola virus by targeting viral glycoprotein [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(12): 4378-

- 4389.
- [8] 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): 1346-56.
- [9] Mokhber-Dezfuli N, Saeidnia S, Gohari A R, et al. Phytochemistry and pharmacology of berberis species [J]. *Pharmacogn Rev*, 2014, 8(15): 8-15.
- [10] Roy N S, Park N I, Kim N S, et al. Comparative transcriptomics for genes related to berberine and berbamine biosynthesis in Berberidaceae [J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(20): 2676.
- [11] Yousaf T, Rafique S, Wahid F, et al. Phytochemical profiling and antiviral activity of *Ajuga bracteosa*, *Ajuga parviflora*, *Berberis lycium* and *Citrus lemon* against Hepatitis C Virus [J]. *Microb Pathog*, 2018, 118: 154-158.
- [12] Huang L H, Li H N, Ye Z D, et al. Berbamine inhibits Japanese encephalitis virus (JEV) infection by compromising TPRMLs-mediated endolysosomal trafficking of low-density lipoprotein receptor (LDLR) [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1): 1257-1271.
- [13] Wang B X, Fish E N. The Yin and Yang of viruses and interferons [J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(4): 190-197.
- [14] Bergman S, Ferguson M C, Santanello C. Interferons as therapeutic agents for infectious diseases [J]. *Infect Dis Clin N Am*, 2011, 25: 819-834.
- [15] Schreiber G. The role of type I interferons in the pathogenesis and treatment of COVID-19 [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 595739.
- [16] Tsubota A. Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(4): 419.
- [17] Martínez-Gil L, Ayllon J, Ortigoza M B, et al. Identification of small molecules with type I interferon inducing properties by high-throughput screening [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49049.
- [18] Cheng G J, Wang L C, Fridlender Z G, et al. Pharmacologic activation of the innate immune system to prevent respiratory viral infections [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(3): 480-488.
- [19] Konishi H, Okamoto K, Ohmori Y, et al. An orally available, small-molecule interferon inhibits viral replication [J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 259.
- [20] Lucas-Hourani M, Dauzonne D, Jorda P, et al. Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(10): e1003678.
- [21] Patel D A, Patel A C, Nolan W C, et al. High throughput screening for small molecule enhancers of the interferon signaling pathway to drive next-generation antiviral drug discovery [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36594.

[责任编辑 兰新新]