

异土木香内酯体外抗病毒作用与机制研究

孔令东^{1#}, 刘霞^{2#}, 李艺颖², 王靳勇¹, 董秋童¹, 李敏², 禹艳丽¹, 刘哲¹, 贾鑫^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100027

2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100027

摘要: 目的 研究异土木香内酯的体外抗病毒作用及机制。方法 CCK-8法检测0.125、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000、16.000、32.000、64.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的异土木香内酯处理24 h对人非小细胞肺癌细胞系(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-eGFP)以0.02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的异土木香内酯5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对GFP阳性细胞率的影响; VSV感染(MOI=0.1) A549细胞, Western blotting检测异土木香内酯处理16 h对VSV病毒G蛋白表达的影响; 分别使用甲型流感病毒(H1N1, MOI=0.1)、脑心肌炎病毒(EMCV, MOI=0.1)感染A549细胞, 同时给药共同孵育8 h后, 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测异土木香内酯对病毒RNA表达的影响; 异土木香内酯分别以预处理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-eGFP在A549细胞中复制的影响; 异土木香内酯20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理胚胎成纤维(MEF)细胞12 h, 进行转录组测序分析; 异土木香内酯5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理MEF细胞12 h, qRT-PCR检测干扰素 $\alpha 1$ (*Ifna1*)、干扰素 $\beta 1$ (*Ifnb1*)、干扰素诱导蛋白44(*Ifi44*)、干扰素刺激基因15(*Isg15*)的mRNA表达。结果 异土木香内酯对A549细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为51.01 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 与模型组比较, 流式结果显示异土木香内酯显著减少VSV-eGFP阳性细胞率($P<0.001$), 但对病毒的吸附过程没有影响, 药物预处理及吸附后给药显著抑制VSV病毒复制($P<0.01$ 、 0.001); qRT-PCR结果显示异土木香内酯显著降低H1N1、EMCV病毒的mRNA水平($P<0.001$); Western blotting结果显示异土木香内酯显著抑制VSV的G蛋白表达($P<0.001$); 转录组测序分析和qRT-PCR结果表明, 异土木香内酯促进I型干扰素通路的激活, 并诱导*Ifna1*、*Ifnb1*、*Ifi44*、*Isg15*($P<0.001$)表达。结论 异土木香内酯通过促进基于干扰素通路的抗病毒天然免疫激活, 发挥抑制病毒复制的作用。

关键词: 土木香; 异土木香内酯; 水疱性口炎病毒(VSV); 甲型流感病毒(H1N1); 脑心肌炎病毒(EMCV); 抗病毒免疫; 干扰素; 干扰素刺激基因

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)03-0521-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.009

In vitro antiviral function and mechanism of isoalantolactone

KONG Lingdong¹, LIU Xia², LI Yiyi², WANG Jinyong¹, DONG Qiutong¹, LI Min², YU Yanli¹, LIU Zhe¹, JIA Xin¹

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

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

Abstract: Objective To examine the antiviral activity *in vitro* and explore the mechanism of action of isoalantolactone. **Methods** The CCK-8 assay was used to evaluate the effect of isoalantolactone (0.125, 0.500, 1.000, 2.000, 4.000, 8.000, 16.000, 32.000, and 64.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the viability of A549 cells. The vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein (VSV-eGFP) infected A549 cells with 0.02 multiplicity of infection (MOI). Flow cytometry was used to detect the effect of isoalantolactone 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ co-incubated for 12 h on the proportion of GFP positive cells. VSV infected A549 cells, and the effect of isoalantolactone co-incubated for 12 h on the expression of VSV-G protein was detected by Western blotting. A549 cells were infected with influenza A virus (H1N1, MOI = 0.1), myocarditis virus (EMCV, MOI = 0.1), respectively. After co-incubation for

收稿日期: 2023-10-07

基金项目: 中国科协青年人才托举工程项目(2020-QNRC1-03)

*共同第一作者: 孔令东, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: kld0513@163.com

刘霞, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: xialiu0203@163.com

*通信作者: 贾鑫, 副教授, 研究方向为中药抗病毒免疫药理。E-mail: jiaxin@bucm.edu.cn

8 h, the effect of isovalantolactone on virus RNA expression was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). Isovalantolactone was administered in 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-eGFP replication in A549 cells was detected by flow cytometry. MEF cells were treated with isophorolide ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 12 h and subjected to transcriptome sequencing analysis. Treatment of MEF cells with isophorolide (5, 10, and $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 12 h, qRT-PCR method was used to detect mRNA expression of interferon $\alpha 1$ (*Ifna1*), interferon $\beta 1$ (*Ifnb1*), interferon induced protein 44 (*Ifi44*), and interferon stimulated gene 15 (*Isg15*). **Results** isovalantolactone exhibited an IC_{50} of $51.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in A549 cells. Treatment with isovalantolactone resulted in a significant reduction in VSV-eGFP positive cells ($P < 0.001$), as revealed by flow cytometry. Isovalantolactone had no effect on the adsorption process of virus, while pre-treatment or administration after adsorption can significantly inhibit virus replication ($P < 0.01, 0.001$). Isovalantolactone led to a significant decrease in the mRNA levels of H1N1 and EMCV, as indicated by qRT-PCR results ($P < 0.001$). Transcriptome sequencing analysis and qRT-PCR results demonstrated that isovalantolactone enhanced the activation of the type I interferon pathway and upregulated the expression of *Ifna1*, *Ifnb1*, *Ifi44*, and *Isg15* ($P < 0.001$). **Conclusion** Isovalantolactone has the potential to suppress viral replication by enhancing the antiviral innate immunity mediated through the type I interferon pathway.

Key words: *Inula helenium* L.; isovalantolactone; vesicular stomatitis virus (VSV); influenza A virus (H1N1); encephalomyocarditis virus (EMCV); antiviral immunity; interferon; interferon-stimulated genes

土木香 *Inula helenium* L. 辛、苦, 温, 归肝、脾经, 系蒙古族验方四味土木香散的主药, 该方清瘟解表, 用于瘟病初期发冷发热、头痛咳嗽、咽喉肿痛的治疗^[1]。异土木香内酯是从土木香中提取出来的倍半萜烯内酯类小分子化合物, 为药典规定的四味土木香散和土木香的标准品成分^[2-3]。现代研究表明, 异土木香内酯具有抗炎、抗菌和抗癌等药理活性^[4-5], 然而关于其临床主治相关的抗病毒感染活性与机制研究未见报道。

机体的固有免疫系统是抵抗病毒感染的重要防线。病毒入侵机体后, 宿主细胞通过多种模式识别受体 (PRRs) 识别病毒入侵信号。已报道的 PRRs 包括可识别病毒复制中间产物 dsRNA 和 5'pppRNA 的视黄酸诱导基因蛋白 I (RIG-I) 样受体 (RLRs)、识别 RNA 或 DNA 病毒的 Toll 样受体 (TLRs)、识别 RNA 病毒的 Nod 样受体 (NLRs) 以及识别 DNA 病毒的环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合成酶受体 (cGAS) 等。当 PRRs 与相应的病原相关分子模式 (PAMPs) 结合后, 会启动一系列的信号转导过程, 进而诱导 I 型干扰素 (IFN) 的表达^[6]。分泌到细胞外的 IFN 与细胞膜表面的 IFN 受体结合^[7], 通过 JAK-STAT 通路诱导数百种干扰素刺激基因 (ISGs) 的表达^[8], 这些 ISGs 一方面增强机体的抗病毒免疫应答, 一方面直接从病毒复制的各个环节抑制病毒扩增, 从而抵御病毒感染^[9-13]。研究表明, 中药可以通过调节机体免疫功能发挥抗病毒作用^[14-16]。

本研究通过病毒感染的细胞模型, 研究异土木香内酯对水疱性口炎病毒 (VSV)、甲型流感病毒 (H1N1)、脑心肌炎病毒 (EMCV) 复制的抑制作

用, 初步探讨其通过激活抗病毒天然免疫应答发挥抗病毒功能的分子机制, 为中药土木香及蒙药四味土木香散的抗病毒研究提供科学的数据支撑。

1 材料

1.1 药品和主要试剂

异土木香内酯 (货号 PS0730-0020, 质量分数 $\geq 98.0\%$) 购于成都普思生物科技股份有限公司, 用二甲基亚砜 (DMSO) 充分溶解, 配制成 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 保存于 -80°C 备用; DMSO (货号 D4540) 购于 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基 (货号 C11995500 CP)、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; 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; 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 IgG 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 细胞系购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 公司、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°C 、5%

CO₂ 细胞培养箱培养。表达增强型绿色荧光蛋白(GFP)的水疱性口炎病毒(VSV-eGFP)、野生型VSV、H1N1、EMCV由本实验室提供,扩增后置于-80℃保存。

1.3 主要仪器

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、Epoch全波长酶标仪(美国Bio Tek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);倒置荧光显微镜购于日本Olympus公司。

2 方法

2.1 细胞活力测定

A549细胞以每孔 2.5×10^4 个接种于96孔板,培养过夜使完全贴壁;用DMEM完全培养基配制0(对照)、0.125、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000、16.000、32.000、64.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的异土木香内酯,以每孔100 μL 加入96孔板中,每个浓度设置3个复孔,于5% CO₂、37℃细胞培养箱中培养,空白组不接种细胞,其余操作与对照组相同;24 h后向每孔加入10 μL 的CCK-8溶液,重新置于细胞培养箱中孵育30 min,使用酶标仪测定450 nm处吸光度(A)值,计算细胞存活率。

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

2.2 流式细胞术检测A549细胞中异土木香内酯对VSV-eGFP病毒复制的影响

A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种于24孔板,培养过夜使完全贴壁;VSV-eGFP以0.02的感染复数(MOI)感染细胞(以GFP阳性细胞率显著加作

为模型成功标准),同时加入异土木香内酯5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共同培养,12 h后PBS清洗细胞1次,加入100 μL 胰酶消化,200 μL 完全培养基终止消化,收集细胞,置于流式管中于Beckman Coulter流式细胞仪,以488 nm激光器激发,FITC荧光通道收集荧光信号,采集10 000个细胞进行后续分析,以未感染组A549细胞作对照,分析GFP阳性细胞的百分率。

2.3 Western blotting检测异土木香内酯对VSV病毒复制的影响

A549细胞以每孔 2.4×10^5 个接种于12孔板,VSV-WT以0.1的MOI感染细胞16 h,同时加入异土木香内酯5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共同培养,16 h后加入80 μL 的IP裂解液充分裂解细胞,离心后取上清,加入Loading Buffer 100℃使蛋白完全变性,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),回收一抗,1×TBST洗膜3次,每次5 min,室温孵育羊抗兔二抗(1:5 000)2 h,加入ELC化学发光试剂,于凝胶成像仪中曝光显影。

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 个接种于24孔板,培养过夜使完全贴壁,MOI为0.1的EMCV和H1N1感染细胞8 h,同时加入异土木香内酯5、10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共同培养。孵育至指定时间后,收集细胞,使用Trizol提取总RNA。提取总RNA后,根据Evo M-MLV RT Kit说明书进行反转录,将RNA反转成cDNA后进行qRT-PCR实验,检测病毒基因的RNA表达水平。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	
<i>β-actin</i>	F-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	R-GCCGGACTCATCGTACTCC
<i>Ifnb1</i>	F-AGCTCCAAGAAAGGACGAACA	R-GCCCTGTAGGTGAGGTTGAT
<i>Ifna1</i>	F-TCCCCTCTCTCCTGCCTGAAG	R-GAGGGTTGTATTCCATGCAGCA
<i>Ifi44</i>	F-ATGCTCCAAGTACTGCTCG	R-ACAGCAATGCCTCTTGTCTTT
<i>Isg15</i>	F-GGTGTCCGTGACTAACTCCAT	R-CTGTACCACTAGCATCACTGTG
<i>H1N1-HA</i>	F-CCCGGAAATAGCAGAAAGACCCAAAGTA	R-GCCGGACCCAAAGCCTCTACTCAGT
<i>EMCV-IC</i>	F-CCGCGATGATGAAGGGCAAG	R-CGGGCATCCTGGTGGGTAAGT

2.5 流式细胞术检测异土木香内酯对VSV-eGFP病毒复制周期的影响

异土木香内酯分别以预处理、病毒吸附过程中

给药、吸附后给药3种给药方式,通过流式细胞术检测其对VSV-eGFP在A549细胞中复制的影响。

预处理:A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种于24

孔板,培养过夜使完全贴壁,异土木香内酯 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 单独处理 12 h,吸弃培养基,PBS清洗3遍,加入 VSV-eGFP(MOI=0.05),感染 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:A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种于 24 孔板,培养过夜使完全贴壁,4 °C 预冷 10 min,加入 VSV-eGFP(MOI=0.05)感染细胞,同时加入异土木香内酯处理,继续置于 4 °C 孵育 2 h,吸弃培养基,PBS清洗3遍,重新加入培养基培养 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:A549细胞以每孔 1.2×10^5 个接种于 24 孔板,培养过夜使完全贴壁,4 °C 预冷 10 min,加入 VSV-eGFP(MOI=0.05)感染细胞 2 h,吸弃培养基,PBS清洗3遍,重新加入含有异土木香内酯的完全培养基,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。

2.6 RNA测序及转录组分析

MEF细胞以每孔 2.4×10^5 个接种到 12 孔板中,培养过夜使完全贴壁,异土木香内酯 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 单独处理 12 h,收集细胞,使用 Trizol 提取总 RNA。对 RNA 进行质检,由武汉华大基因股份有限公司进行测序分析。使用 GSEA 软件对基因组富集分析,基因集来自 MSigDB 数据库。

2.7 qRT-PCR 检测异土木香内酯对 ISGs 相关 mRNA 表达的影响

MEF细胞以每孔 2.5×10^5 个接种到 12 孔板中,培养过夜使完全贴壁,异土木香内酯 5、10、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 12 h,收集细胞,使用 Trizol 提取总 RNA。根据 Evo M-MLV RT Kit 说明书进行反转录,将 RNA 反转成 cDNA 后进行 qRT-PCR 实验,检测干扰素 $\alpha 1$ (*Ifna1*)、干扰素 $\beta 1$ (*Ifnb1*)、干扰素诱导蛋白 44(*Ifi44*)、干扰素刺激基因 15(*Isg15*)的 mRNA 表达。引物序列见表 1。

2.8 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。

3 结果

3.1 异土木香内酯对 A549 细胞相对存活率的影响

如图 1 所示,异土木香内酯对 A549 细胞存活率的影响通过 CCK-8 法检测,计算得到半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $51.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下无明显细胞毒性,因此在后续实验中,异

土木香内酯的使用浓度选取在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下。

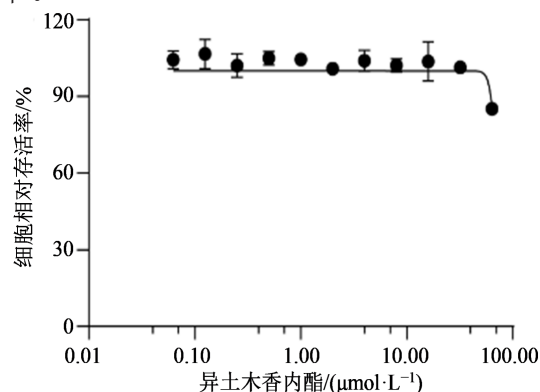


图1 异土木香内酯对 A549 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

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

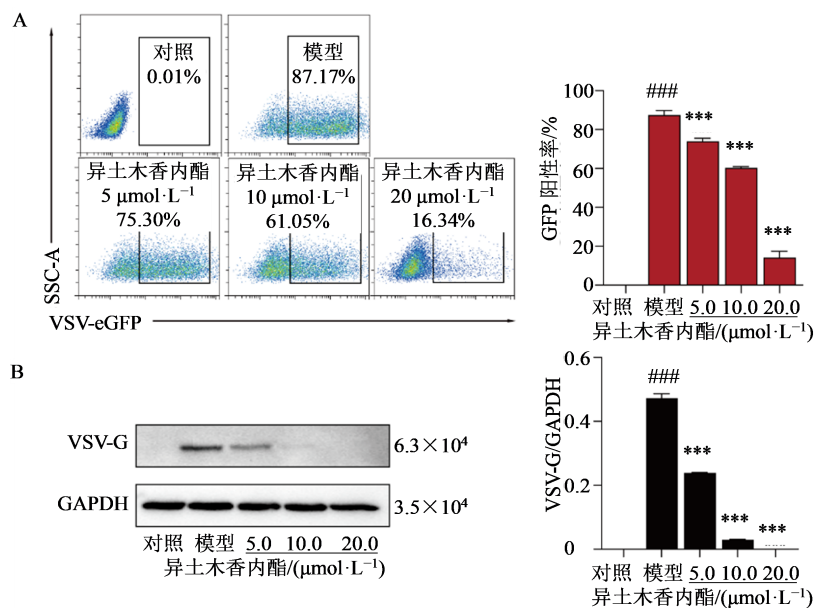
3.2 异土木香内酯抑制病毒复制

3.2.1 异土木香内酯对 VSV 复制的影响 通过流式细胞术检测 GFP 阳性率反映 VSV-eGFP 病毒的复制情况,结果如图 2-A 所示,与对照组相比,模型组 GFP 阳性细胞率显著增加 ($P<0.001$);与模型组比较,异土木香内酯剂量相关性地降低了 GFP 阳性细胞率 ($P<0.001$)。此外,通过 Western blotting 实验检测异土木香内酯在蛋白水平上对 VSV 病毒复制的影响,如图 2-B 所示,与对照组比较,模型组 VSV-G 蛋白的表达显著增加 ($P<0.001$);与模型组比较,异土木香内酯剂量相关性地降低了 VSV-G 蛋白水平 ($P<0.001$)。

3.2.2 异土木香内酯对 EMCV、H1N1 病毒复制的影响 为了探究异土木香内酯对不同病毒的抑制作用,EMCV 和 H1N1 感染 A549 细胞,通过 qRT-PCR 检测病毒 mRNA 水平,明确异土木香内酯对上述病毒的抑制作用。如图 3 所示,模型组的病毒 mRNA 水平显著高于对照组 ($P<0.001$);与模型组比较,异土木香内酯剂量相关性地抑制了病毒基因的表达,其中中、高剂量组差异显著 ($P<0.001$)。结果表明,异土木香内酯能够在细胞水平上抑制 H1N1、EMCV 的复制。

3.3 异土木香内酯对 VSV 生命周期的影响

为了探究异土木香内酯抑制病毒生命周期的具体阶段,添加时间测定被应用到实验中,如图 4 所示,异土木香内酯预处理的 A549 细胞,与模型组相比, GFP 阳性细胞率显著降低,其中中、高剂量组差异显著 ($P<0.01, 0.001$);在吸附过程中给药时,异土木香内酯处理的细胞与模型组相比未显示出 GFP 阳性细胞率的显著差异;在病毒吸附 2 h 后给

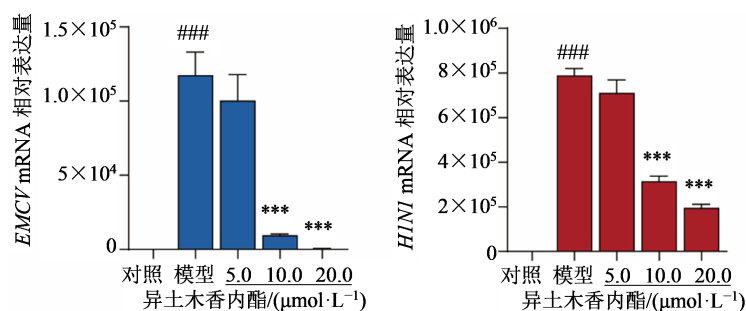


与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group.

图2 异土木香内酯对VSV感染的A549细胞中VSV-eGFP阳性率(A)和VSV-G蛋白表达(B)的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of isoalantolactone on proportion of VSV-eGFP-infected cells (A) and VSV-G protein expression (B) in VSV-infected A549 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs model group.

图3 异土木香内酯对A549细胞中EMCV和H1N1病毒复制的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

药,与模型组相比,异土木香内酯显著降低了GFP阳性细胞率,其中中、高剂量组差异显著($P < 0.001$)。结果表明,异土木香内酯不影响VSV病毒的吸附过程,药物预处理及吸附后处理显著抑制VSV复制。

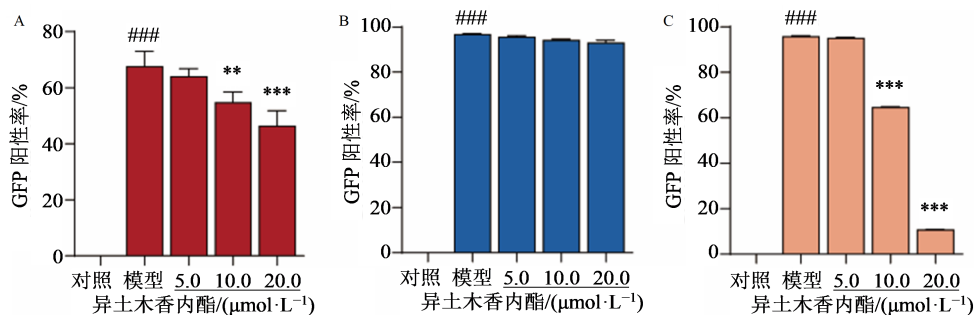
3.4 转录组分析显示异土木香内酯激活先天免疫应答

为了探究异土木香内酯抑制多种病毒的分子机制,对异土木香内酯处理的MEF细胞进行了转录组测序分析,如图5-A所示,与对照组相比,异土木香内酯处理细胞诱导了1 206个差异基因,其中上调基因760个,下调基因446个。对得到的差异基因进行京都基因和基因组数据库(KEGG)通路富集

分析,结果显示病毒感染和抗病毒天然免疫相关的通路被显著富集,主要包括EB病毒感染、甲流病毒感染、I型单纯疱疹病毒感染和TLR信号通路等,详见图5-B。更重要的是,基于基因表达值的GSEA分析发现异土木香内酯处理组显著富集到与抗病毒天然免疫反应相关的IFN- α 信号通路(图5-C)。结果提示,异土木香内酯可能通过激活细胞内基于IFN通路的抗病毒天然免疫,进而发挥抵抗病毒的功能。

3.5 异土木香内酯活化IFN-I信号通路

为了探究异土木香内酯对IFN信号通路的调控作用,检测了异土木香内酯处理MEF细胞中I型干扰素 $Ifna1$ 和 $Ifnb1$ 以及下游干扰素刺激基因 $Ifi44$ 、



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 4 异土木香内酯预处理(A)、吸附过程中(B)、病毒吸附 2 h 后(C)给药对 VSV-eGFP 感染细胞比例的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Effect of pre-treatment (A), adsorption process (B), and virus adsorption for 2 hours (C) on proportion of VSV-eGFP infected cells by administration of isophorolide ($\bar{x} \pm s, n=3$)

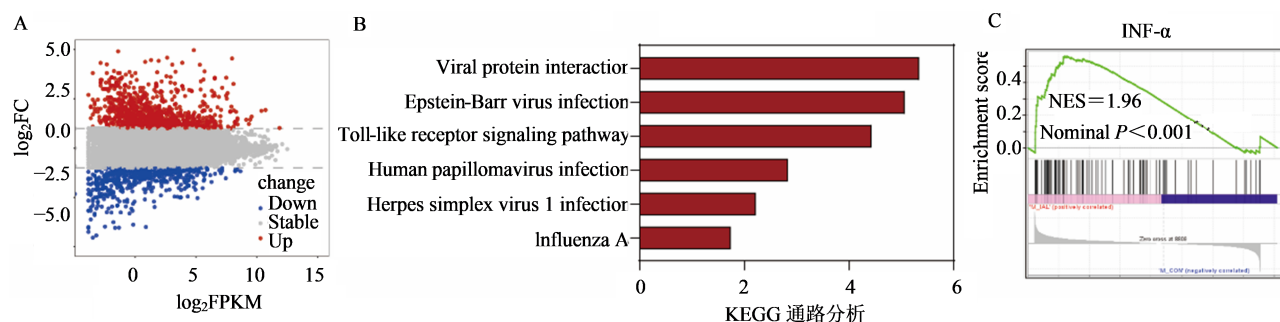


图 5 异土木香内酯转录组的差异表达基因(A)、KEGG 通路分析(B)和 GSEA(C)

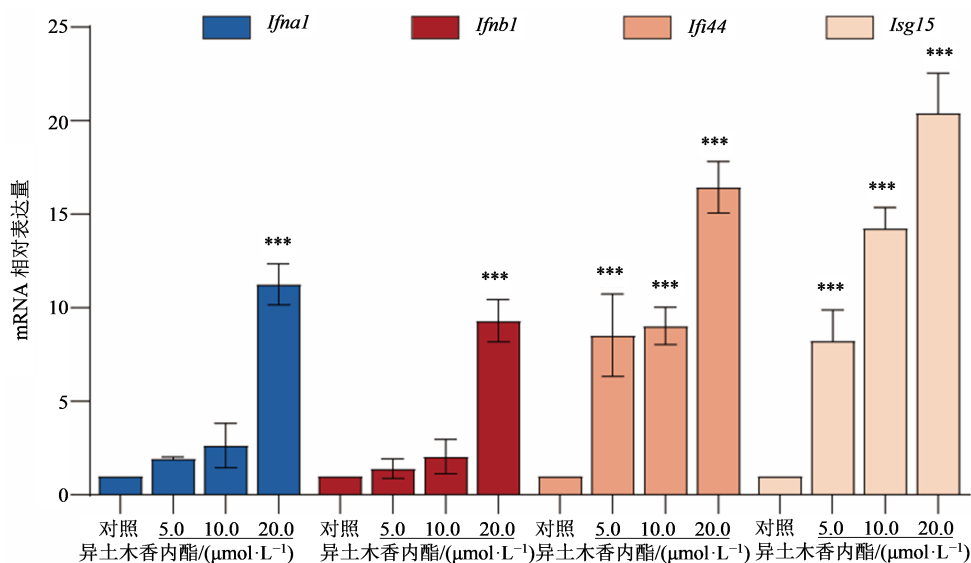
Fig. 5 Differentially expressed genes of isovalantolactone transcriptome (A), KEGG pathway analysis (B) and GSEA (C)

Isg15 的表达情况。如图 6 所示,与对照组比较,异土木香内酯处理显著诱导 *Ifna1* 和 *Ifnb1* 表达($P < 0.001$), *Ifi44* 和 *Isg15* 的 mRNA 水平也显著上调($P < 0.001$)。这些结果表明,异土木香内酯处理

能激活 IFN 信号通路,诱导 I 型干扰素和干扰素刺激基因的表达。

4 讨论

蒙药四味土木香散系蒙古族验方,由土木香、



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control.

图 6 异土木香内酯激活 IFN-I 通路相关基因的表达($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

苦参、悬钩子木及山萘组成^[2],用于治疗瘟疫初期改善发冷发热、头痛咳嗽、咽喉肿痛、胸胁作痛等症状,临床上该方主要用于感冒、鼻炎、咽炎、病毒性肝炎、手足口病、病毒性感冒、伤风、瘟疫及新型冠状病毒肺炎的防治^[17]。然而关于“四味土木香散”抗病毒感染的物质基础及分子机制仍不明确。

异土木香内酯是药典规定的土木香和四味土木香散质量评价的对照成分,具有抗炎、抗菌、抗增殖和神经保护等多种药理作用^[4],可用于预防和治疗炎症性疾病、神经退行性疾病、急性肺损伤和抗肿瘤^[18-19]。已有研究表明,异土木香内酯是中药土木香中的主要化学成分,同时也是主要的入血成分^[7]。异土木香内酯可以抑制泛素连接酶6(TRAFF6)磷酸化,抑制核因子- κ B(NF- κ B)通路,从而抑制炎症信号,减轻急性肺损伤,提高脓毒症小鼠的存活率;此外,1项针对金黄色葡萄球菌的研究显示,异土木香内酯能够抑制金黄色葡萄球菌产生 α 毒素,降低其致病性,其可以恢复多黏菌素耐药型肠杆菌科(如肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌)对多黏菌素B的敏感性^[20-21]。在抗肿瘤方面,异土木香内酯能通过诱导内质网应激,抑制STAT3磷酸化来诱导癌细胞凋亡^[16]。通过诱导HO-1等细胞抗氧化酶,抑制NF- κ B信号,异土木香内酯能预防 β -淀粉样蛋白诱导的调节神经炎症和神经元凋亡,改善小鼠帕金森症状^[22],但关于其临床主治相关的抗病毒感染活性和机制研究未见报道。

本研究通过生物信息学分析和实验验证,首次发现异土木香内酯单独处理可以激活原代细胞IFN信号通路,并上调了大量抗病毒感染相关基因表达,利用流式细胞术、qRT-PCR等技术首次发现异土木香内酯可在细胞水平抑制VSV、EMCV、H1N1的复制。通过不同阶段加药处理,发现异土木香内酯预处理和在病毒吸附后处理的抗病毒效应最优。上述结果表明异土木香内酯通过激活宿主细胞的抗病毒天然免疫反应,诱导细胞开启了“抗病毒状态”,提升了细胞对病毒的抵抗能力。

本研究揭示了土木香主要活性成分异土木香内酯的抗病毒新活性,并初步阐明其通过激活基于IFN通路的抗病毒天然免疫发挥抵抗多种病毒的分子机制。为土木香及蒙药四味土木香散的临床应用提供了理论支持,并为其未来抗病毒的研究指明了新方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 马春雷, 王丽娟. 浅谈四味土木香散的临床应用 [J]. 中国民族医药杂志, 2012, 18(3): 59.
Ma C L, Wang L J. Clinical application of Siwei Tuxiang Powder [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2012, 18(3): 59.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [3] 白丽明, 王剑, 付美玲, 等. 土木香化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2512-2518.
Bai L M, Wang J, Fu M L, et al. Chemical constituents from *Inula helenium* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(11): 2512-2518.
- [4] Xu L, Sun Y N, Cai Q H, et al. Research progress on pharmacological effects of isovalantolactone [J]. J Pharm Pharmacol, 2023, 75(5): 585-592.
- [5] 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.
- [6] Lazear H M, Schoggins J W, Diamond M S. Shared and distinct functions of type I and type III interferons [J]. Immunity, 2019, 50(4): 907-923.
- [7] Pestka S, Krause C D, Walter M R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors [J]. Immunol Rev, 2004, 202: 8-32.
- [8] Thompson M R, Kaminski J J, Kurt-Jones E A, et al. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection [J]. Viruses, 2011, 3(6): 920-940.
- [9] Gao S, von der Malsburg A, Paeschke S, et al. Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA [J]. Nature, 2010, 465(7297): 502-506.
- [10] Li C F, Deng Y Q, Wang S, et al. 25-hydroxycholesterol protects host against Zika virus infection and its associated microcephaly in a mouse model [J]. Immunity, 2017, 46(3): 446-456.
- [11] Klein S, Golani G, Lolicato F, et al. IFITM3 blocks influenza virus entry by sorting lipids and stabilizing hemifusion [J]. Cell Host Microb, 2023, 31(4): 616-633. e20.
- [12] Lenschow D J, Lai C, Frias-Staheli N, et al. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(4): 1371-1376.
- [13] Wang X Y, Hinson E R, Cresswell P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts [J]. Cell Host Microb, 2007, 2(2): 96-105.
- [14] 王浩嘉, 李森, 连瑞, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(6): 1185-1192.
- Wang H J, Li S, Lian R, et al. Antiviral effect *in vitro* and mechanism study based on type I interferon pathway of berbamine [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(6): 1185-1192.
- [15] 成翠芹, 马文福, 李琪琪, 等. 隐丹参酮体外抗病毒作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(9): 1706-1715.
- Cheng C Q, Ma W F, Li Q Q, et al. *In vitro* antiviral function and mechanism of cryptotanshinone [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(9): 1706-1715.
- [16] Zhang M Q, Jia X, Cheng C Q, et al. Capsaicin functions as a selective degrader of STAT3 to enhance host resistance to viral infection [J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(11): 2253-2264.
- [17] 张男. 蒙药"四味土木香散" 主要成分的药代动力学研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2021.
- Zhang N. Pharmacokinetics study on the main components of Mongolian medicine "siwei Tumuxiang San" [D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2021.
- [18] Ding Y H, Song Y D, Wu Y X, et al. Isoalantolactone suppresses LPS-induced inflammation by inhibiting TRAF6 ubiquitination and alleviates acute lung injury [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(1): 64-74.
- [19] Rasul A, Di J, Millimouno F M, et al. Reactive oxygen species mediate isoalantolactone-induced apoptosis in human prostate cancer cells [J]. Molecules, 2013, 18(8): 9382-9396.
- [20] Qiu J Z, Luo M J, Wang J F, et al. Isoalantolactone protects against *Staphylococcus aureus* pneumonia [J]. FEMS Microbiol Lett, 2011, 324(2): 147-155.
- [21] He G D, Zhang X, Chen Y H, et al. Isoalantolactone inhibits LPS-induced inflammation via NF- κ B inactivation in peritoneal macrophages and improves survival in sepsis [J]. Biomedicine Pharmacother, 2017, 90: 598-607.
- [22] He D W, Liu Y T, Li J, et al. Isoalantolactone (IAL) regulates neuro-inflammation and neuronal apoptosis to curb pathology of Parkinson's disease [J]. Cells, 2022, 11(18): 2927.

[责任编辑 兰新新]